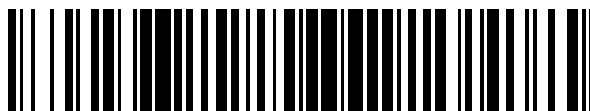


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 998**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C12P 7/64	(2006.01)
C08B 1/00	(2006.01)
C08B 1/08	(2006.01)
C08H 7/00	(2011.01)
C08H 8/00	(2010.01)
C08B 37/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/EP2014/077465**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086783**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14809889 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3080288**

54 Título: **Método de procesamiento de material lignocelulósico utilizando un compuesto catiónico**

30 Prioridad:

11.12.2013 EP 13196742

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.07.2019

73 Titular/es:

**NESTE OYJ (100.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**VAINIO, HEIDI;
MYLLYMÄKI, OLAVI;
PIHLAJANIEMI, VILLE;
SIPPONEN, MIKA;
LAAKSO, SIMO;
LEHTOMÄKI, ILKKA;
PASTINEN, OSSI y
KOSKINEN, PERTTU**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 720 998 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de procesamiento de material lignocelulósico utilizando un compuesto catiónico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para obtener fracciones de azúcar y lignina a partir de materiales lignocelulósicos y a un método para producir aceite unicelular utilizando los azúcares obtenidos a partir de la lignocelulosa. El método también se refiere al reciclado de una corriente de líquido alcalino obtenida del tratamiento de deslignificación de material lignocelulósico.

Antecedentes de la invención

La lignocelulosa es el biopolímero más abundante en la tierra. La lignocelulosa es el principal componente estructural de las plantas leñosas y las plantas no leñosas, como la hierba. La biomasa lignocelulósica se refiere a la biomasa vegetal que se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina. Grandes cantidades de residuos lignocelulósicos se producen a través de la silvicultura, la madera y las industrias de pulpa y papel y las prácticas agrícolas (por ejemplo, paja, rastrojos, bagazo de caña de azúcar, tamo, cáscaras) y muchas agroindustrias. También los desechos municipales contienen fracciones que se pueden considerar residuos de lignocelulosa, como desechos de papel o cartón, desechos de jardines o desechos de madera de la construcción. Los residuos lignocelulósicos, como los residuos agrícolas, ofrecen una alternativa altamente sostenible, no alimenticia y no ILUC (no relacionada con el cambio indirecto del uso de la tierra) para la producción de biocombustibles. Además, debido a la alta abundancia y al bajo precio, los residuos lignocelulósicos son materiales preferidos para la producción de biocombustibles. Además, los cultivos energéticos dedicados a leña o herbáceos con productividad de biomasa han ganado interés como uso de biocombustibles.

La producción de biocombustibles, especialmente etanol, a partir de materiales lignocelulósicos mediante fermentaciones microbianas se ha estudiado ampliamente. El mayor desafío para la utilización de materiales lignocelulósicos para la producción microbiológica de biocombustibles o materias primas para biocombustibles radica en la complejidad del material lignocelulósico y en su resistencia a la biodegradación. En la lignocelulosa, las fibras de celulosa (20-50 % del peso seco de la planta) están incrustadas en la matriz unida covalentemente de hemicelulosa (20-40 %), pectina (2-20 %) y lignina (10-25 %) formando una estructura muy resistente para la biodegradación.

Además, los residuos de azúcar de la hemicelulosa contienen una mezcla variable de hexosas (por ejemplo, glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (por ejemplo, arabinosa y xilosa) dependiendo de la biomasa.

Ciertos microorganismos pueden producir lípidos a partir de moléculas orgánicas, tales como azúcares procedentes de la lignocelulosa. Ciertos microorganismos, normalmente levaduras, hongos o bacterias, pueden convertir eficazmente los azúcares C6 y C5 de materiales lignocelulósicos en aceite. El aceite producido por microorganismos heterótrofos a menudo se denomina aceite unicelular o aceite microbiano. El proceso de producción de aceite unicelular que utiliza microorganismos heterótrofos comprende cultivar microorganismos en biorreactores aireados, permitir que las células acumulen lípidos, recolectar células ricas en lípidos y recuperar el aceite de las células. Los lípidos basados en microorganismos (es decir, aceites unicelulares) se pueden utilizar como materias primas para la producción de biocombustibles tales como biodiésel, diésel renovable o bioqueroseno.

La producción económicamente viable de biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos mediante fermentación microbiana requiere la conversión eficaz de todos los principales componentes de hidratos de carbono de los materiales lignocelulósicos a biocombustibles. Por otro lado, la viabilidad económica de la producción de biocombustibles requiere que todos los principales componentes de hidratos de carbono del material lignocelulósico se conviertan en azúcares, que son adecuados para la fermentación microbiana. En general, esto significa romper (hidrolizar) las estructuras poliméricas de fracciones de celulosa y hemicelulosa para obtener azúcares monoméricos.

La técnica anterior desvela varios métodos, que tienen como objetivo la producción de azúcares a partir de materiales lignocelulósicos y el uso de azúcares en un proceso de fermentación microbiana.

Ruan et al., Bioresource Tech., 2012, vol. 110, pág. 198-205, se refiere al uso del hongo *M. isabellina* para evaluar la conversión de diferentes fuentes de carbono en medios sumergidos a lípidos y su posible uso en la administración de biomasa lignocelulósica para la producción de biodiesel.

La publicación de patente WO2010039783A1 describe un método para producir azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos, en cuyo método la lignina disuelta durante el tratamiento con álcali se adsorbe a un polímero de almidón catiónico antes de conducir la fracción celulósica a un tratamiento de hidrólisis enzimática. La publicación no incluye la separación del líquido de deslignificación alcalina después del tratamiento de deslignificación antes de la hidrólisis enzimática para recuperar la lignina del líquido de deslignificación, y para

reciclar la corriente líquida de nuevo al tratamiento de designificación después de la recuperación de la lignina con el compuesto catiónico sin el cambio de pH. En el método conocido, la lignina adsorbida no se elimina de la fracción celulósica antes del tratamiento de hidrólisis enzimática. De acuerdo con las enseñanzas del documento WO2010039783A1, la adsorción de lignina mejora el tratamiento de hidrólisis enzimática.

5 Tanaka, M. et al., Biotech, and Bioengineering, 1988, vol. 32, pág. 897-902, se refiere a la eliminación de lignina y la reutilización de celulasas para la sacarificación continua de lignocelulosas, y concluye que la pérdida de actividad de celulosa aumentó con el aumento del tiempo de agitación, pero podría controlarse mediante la recuperación a una velocidad baja de agitación.

10 El documento WO 2010/025455 se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de un material que contiene lignocelulosa e incluye un tratamiento previo del material que contiene lignocelulosa; la introducción de quitosano o un polímero similar a quitosano en el material que contiene lignocelulosa pretratada; exponer el material que contiene lignocelulosa pretratada a una cantidad eficaz de una enzima hidrolizante; y fermentar con un organismo de fermentación para producir un producto de fermentación.

15 La publicación de patente IN217148B desvela un método para la separación de lignina de líquido negro de un proceso de fabricación de pasta con una combinación de un floculante tal como un polímero de almidón catiónico y un coagulante tal como un ácido mineral con un cambio de pH a menos de pH 6.

20 Uno de los principales desafíos en la producción de azúcares lignocelulósicos a partir de material lignocelulósico es proporcionar un proceso, que permita la producción rentable de hidrolizados de azúcar de alta calidad, que se puedan utilizar en una producción posterior de la etapa de fermentación. La alta calidad de los hidrolizados de azúcar significa que la cantidad de impurezas tales como fenoles y ácidos debe estar por debajo de la concentración, que es tóxica para el microorganismo utilizado en la fermentación. La rentabilidad requiere que el consumo de productos químicos utilizados en la producción de hidrolizados se mantenga en un nivel bajo. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el reciclado de productos químicos para cocinar. La viabilidad económica también requiere que la calidad de las corrientes secundarias, que no se utilizan como materia prima para la fermentación microbiana, sea lo más alta posible para permitir la valorización de estas corrientes.

25 Las tecnologías de pretratamiento con lignocelulosa de vanguardia han sido diseñadas para fermentaciones anaeróbicas (etanol celulósico). La producción de aceite microbiano difiere de las fermentaciones anaeróbicas, ya que es un proceso aeróbico (requiere oxígeno). Esta invención describe un proceso de fraccionamiento de lignocelulosa que tiene beneficios especialmente para los bioprocesos aeróbicos, como la producción de aceite microbiano. La presente invención es, sin embargo, también aplicable a bioprocesos anaeróbicos.

Sumario de la invención

30 El objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso de fraccionamiento de lignocelulosa, que resuelva los problemas de los procesos de la técnica anterior relacionados con un bajo rendimiento global de azúcar a partir del material lignocelulósico y altos costes químicos de la recolección de los productos sin hidratos de carbono.

35 El método, de acuerdo con la invención, permite la producción de hidrolizados de azúcar para utilizar en la producción de aceite microbiano con microorganismos heterótrofos.

40 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un proceso de fraccionamiento con rendimiento y productividad mejorados del tratamiento de hidrólisis enzimática.

45 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un proceso más rentable y versátil para la recuperación y valorización de fracciones sin hidratos de carbono de lignocelulosa.

50 La invención se basa en un descubrimiento de que la lignina disuelta en el tratamiento con álcali se puede precipitar eficazmente con un compuesto catiónico y que, después de la separación del precipitado, el líquido alcalino se puede reciclar a la etapa de designificación alcalina. El reciclado del líquido alcalino mejora significativamente la rentabilidad de la etapa de tratamiento alcalino.

55 De acuerdo con la invención, la lignina se precipita a pH alcalino mediante la utilización de un compuesto catiónico. Además, la precipitación de lignina con un compuesto catiónico y la separación del precipitado del líquido alcalino se pueden llevar a cabo a pH alcalino sin la necesidad de cambiar el pH. Esto permite un reciclado eficaz del agente alcalino en la etapa de tratamiento alcalino del método de fraccionamiento de lignocelulosa. Dado que el pH no cambia durante la recuperación de lignina, la cantidad de agente alcalino (fresco) de relleno para el tratamiento alcalino es menor en comparación con un caso en el que los compuestos ácidos tienen que disminuir el pH para la recuperación de lignina.

60 La invención también se basa en un hallazgo sorprendente de que mediante la separación de la lignina antes de la etapa de hidrólisis enzimática mediante tratamiento con álcali, la eficacia de la hidrólisis enzimática de las fracciones

celulósicas y la rentabilidad de la fermentación aeróbica se mejoran significativamente. La rentabilidad del cultivo aeróbico se mejora debido a la baja cantidad de material inerte (lignina) y compuestos inhibidores en la fracción de azúcar utilizada en la fermentación aeróbica.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para el fraccionamiento de un material lignocelulósico, comprendiendo el método

10 a) Someter el material lignocelulósico a un tratamiento de deslignificación en presencia de un agente de deslignificación alcalina para producir una mezcla que comprende una primera fase sólida y una primera fase líquida que contiene lignina disuelta, en donde el agente de deslignificación alcalina se agrega al material lignocelulósico para obtener una suspensión que tiene un pH superior a 7,

b) Separar la primera fase sólida de la primera fase líquida,

15 c) Introducir un compuesto catiónico en la primera fase líquida para producir una mezcla que comprende una segunda fase sólida y una segunda fase líquida y en donde la segunda fase líquida se separa de la segunda fase sólida y la segunda fase líquida se recicla al paso a),

20 d) Someter la primera fase sólida a un tratamiento de hidrólisis enzimática en presencia de enzimas capaces de hidrolizar las fracciones de celulosa y hemicelulosa de la primera fase sólida para producir una mezcla que comprenda una tercera fase líquida en forma de un hidrolizado enzimático y una tercera fase sólida,

25 e) Separar la tercera fase líquida de la tercera fase sólida, y en donde el compuesto catiónico se selecciona de un grupo que comprende oligómeros y polímeros catiónicos tales como polisacáridos catiónicos de almidón, amilosa catiónica, amilopectina catiónica, dextrano catiónico, oligómeros de lignina catiónicos, polímeros de lignina catiónicos, turba catiónica, o mezclas de los mismos, o en donde el compuesto catiónico es un ion catiónico elemental seleccionado del grupo que comprende metales alcalinotérreos y cationes bivalentes y trivalentes de hierro (Fe) o aluminio (Al) procedentes de compuestos tales como cloruro de aluminio $AlCl_3$, acetato de bario $Ba(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de bario $Ba(HCO_3)_2$, bromuro de bario $BaBr_2$, cloruro de bario $BaCl_2$, formiato de bario $Ba(HCO_2)_2$, (hidróxido de bario $(Ba(OH)_2)$, nitrato de bario $Ba(NO_3)_2$, acetato de calcio $Ca(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de calcio $Ca(HCO_3)_2$, bromuro de calcio $CaBr_2$, cloruro de calcio $CaCl_2$, formiato de calcio $Ca(HCO_2)_2$, (hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$, nitrato de calcio $Ca(NO_3)_2$, acetato de magnesio $Mg(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de magnesio $Mg(HCO_3)_2$, bromuro de magnesio $MgBr_2$, cloruro de magnesio $MgCl_2$, formiato de magnesio $Mg(HCO_2)_2$, (hidróxido de magnesio $Mg(OH)_2$, nitrato de magnesio $Mg(NO_3)_2$, acetato de hierro $Fe(C_2H_3O_2)_2$, cloruro férrico $FeCl_3$ y los hidratos correspondientes.

Breve descripción de los dibujos

40 Las Figuras 1 a 3 describen esquemas de procesos para el tratamiento de material lignocelulósico.

La Figura 4 describe el proceso para la hidrólisis enzimática de acuerdo con las realizaciones de la invención.

45 La Figura 5 presenta el efecto de la dosis de almidón catiónico en el porcentaje de disminución de la absorbancia a 280 nm y 600 nm después de 4 horas de incubación de la solución de deslignificación con NaOH del Ejemplo 5 a temperatura ambiente.

50 La Figura 6 presenta el efecto de la dosis de almidón catiónico en el porcentaje de disminución de la absorbancia a 280 nm y 600 nm después de 4 horas de incubación de la solución de deslignificación con Na_2CO_3 a temperatura ambiente

55 La Figura 7 presenta una fotografía de los tubos de ensayo que contienen solución de deslignificación con Na_2CO_3 8 horas después de la complementación de almidón catiónico "Raifix 25035". La dosificación de almidón catiónico a materia seca de las soluciones de deslignificación fue de izquierda a derecha 0 mg/g, 0,074 g/g, 0,147 g/g, 0,214 g/g, 0,267 g/g, y 0,332 g/g.

La Figura 8 presenta el efecto de la dosificación del almidón catiónico "Raifix 25035" en la disminución de la absorbancia a 280 nm.

60 La Figura 9 presenta una fotografía de los tubos de ensayo que contienen líquido no alcalino 24 horas después de la complementación de almidón catiónico "Raifix 25035". La dosificación de almidón catiónico a materia seca del líquido no alcalino fue de izquierda a derecha 0 mg/g, 13 mg/g, 28 mg/g, 41 mg/g, y 68 mg/g.

65 La Figura 10 presenta los rendimientos totales de azúcar de la paja deslignificada con NaOH y de la paja autohidrolizada en hidrólisis discontinua después de 24 h, 48 horas y 72 h, después de la 1^a, 2^a y 3^a hidrólisis secuencial y después del reciclado de sólidos y una reacción adicional de 24 h.

La Figura 11 presenta la productividad de las enzimas en la hidrólisis de la paja deslignificada con NaOH y la paja autohidrolizada en hidrólisis discontinua, hidrólisis secuencial y reciclado de sólidos.

La Figura 12 presenta las productividades volumétricas de azúcar de la paja deslignificada con NaOH y la paja autohidrolizada en hidrólisis discontinua, hidrólisis secuencial y reciclado de sólidos. El proceso de 48 horas comprende una hidrólisis discontinua de 48 horas o dos reacciones de hidrólisis secuencial de 24 horas o una reacción de reciclado de sólidos de 24 horas en situación de equilibrio con una tasa de reciclado del 50 %. El proceso de 72 horas comprende una hidrólisis discontinua de 72 horas o tres hidrólisis secuenciales de 24 horas o la reacción de reciclado y una hidrólisis adicional de 24 horas.

La Figura 13 presenta la progresión (rendimiento de azúcar, volumen de reacción y consistencia de reacción) de reacciones consecutivas de reciclado de sólidos en hidrólisis enzimática de paja deslignificada con NaOH y autohidrolizada con una tasa de reciclado del 50 % en términos de hidrólisis (A), volumen de reacción (B) y consistencia de reacción (C).

La Figura 14 presenta el rendimiento (peso seco celular (CDW, de sus siglas en inglés) (g/l), concentración de ácidos grasos (FA, de sus siglas en inglés) (g/l), peso seco celular (CDW) libre de grasa (g/l) y contenido de ácidos grasos (FA) (%) en biomasa microbiana) de la fermentación semicontinua con *Aspergillus oryzae* sobre hidrolizados de hemicelulosa y celulosa de paja de trigo.

La Figura 15 presenta el rendimiento del residuo sólido de la autohidrólisis de la paja de trigo.

La Figura 16 presenta la concentración de azúcar soluble total (g/l, eje y izquierdo) y sustancias inhibidoras microbianas potenciales; furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y compuestos fenólicos solubles (g/l, eje y derecha) en la fracción líquida obtenida de la autohidrólisis de paja de trigo con una consistencia del 10 % (g materia seca sólida de paja/g total).

Tabla 1. Comparación del rendimiento de materia seca (rendimiento de DM) de la paja autohidrolizada con diferentes tratamientos de deslignificación. El rendimiento de azúcar a partir de la hidrólisis enzimática de la paja deslignificada dependía de las condiciones de tratamiento. El rendimiento de azúcar a continuación se proporciona tanto en función de la materia seca de la paja autohidrolizada como en función del contenido de hidratos de carbono de la paja autohidrolizada.

Tabla 2. Precipitación de lignina a partir de sobrenadante alcalino mediante acetato de Ca y mediante tratamientos consecutivos, primero con almidón catiónico y luego con acetato de Ca.

Tabla 3. Precipitación de lignina a partir de sobrenadante alcalino mediante acetato de Ca y mediante tratamientos consecutivos, primero con almidón catiónico y luego con acetato de Ca.

Tabla 4. Composición del medio de crecimiento antes de la alimentación

Descripción detallada de la invención

En la descripción de las realizaciones de la invención, se recurrirá a la terminología específica por razones de claridad.

Definiciones

Material lignocelulósico

Las expresiones "biomasa lignocelulósica" o "material lignocelulósico" deben incluir, pero no se limitan a, plantas leñosas o no leñosas, plantas herbáceas u otros materiales que contengan celulosa y/o hemicelulosa: Los materiales pueden ser residuos agrícolas (como paja de trigo, paja de arroz, tamo, cáscaras, rastrojos de maíz, bagazo de caña de azúcar, cogollos y hojas de caña de azúcar), cultivos energéticos dedicados (como pasto varilla, *Miscanthus*, *Arundo donax*, caña canaria, sauce, jacinto de agua, caña de energía, sorgo de energía), materiales o residuos de madera (incluidos residuos o fracciones de aserraderos y pulpa y/o de las fábricas de papel, tales como hemicelulosa, lejía de sulfito gastado, fibra de desecho y/o fango primario), musgo o turba o desechos municipales de papel. La expresión material lignocelulósico comprende también materiales con bajo contenido de lignina, materiales tales como biomasa de macroalgas. Además, los materiales comprenden también fracciones de celulosa o hemicelulosa de prácticas industriales. La expresión material lignocelulósico abarca cualquier tipo de fracción de celulosa. De acuerdo con esta divulgación, las materias primas o ciertas fracciones, como hemicelulosa y/o celulosa, de materias primas de diferentes orígenes, especies de plantas o procesos industriales se pueden mezclar y utilizar como materias primas para cultivar biomasa de microorganismos. Normalmente, el contenido de lignina en la lignocelulosa es superior al 5 %. La biomasa lignocelulósica también puede contener almidón, por ejemplo, en el caso de plantas enteras.

Hidrólisis

El término "hidrólisis" se refiere, en el presente documento, a la despolimerización mediante la adición de agua en enlaces glucosídicos o enlaces éster de hidratos de carbono no monoméricos a monómeros y oligómeros de azúcar o ácidos carboxílicos.

5 Hidrolizado

Los términos "hidrolizado" o "material hidrolizado" se refieren en el presente documento a material que ha sufrido hidrólisis.

10 Gravedad

El término "gravedad" se refiere, en el presente documento, al factor, que se calcula mediante la ecuación 1 y que describe las condiciones hidrotérmicas en términos de temperatura y tiempo de reacción.

$$15 \quad S = \text{Log}(R_0),$$

donde $R_0 = \int_0^t \exp((T(t) - Tr)/14, 7)] dt$ y Tr es la temperatura base (100 °C).

20 Hidrolizado de lignocelulosa

La expresión "hidrolizado de lignocelulosa" se refiere en el presente documento a productos de hidrólisis de lignocelulosa o material lignocelulósico que comprende celulosa y/o hemicelulosa, oligosacáridos, mono- y/o disacáridos, ácido acético, ácido fórmico, otros ácidos orgánicos, furfural, hidroximetilfurfural, ácido levulínico, compuestos fenólicos, otros productos de hidrólisis y/o degradación formados a partir de lignina, celulosa, hemicelulosa y/u otros componentes de lignocelulosa, compuestos nitrogenados que se originan a partir de proteínas, metales y/o fragmentos de lignocelulosa no hidrolizados o parcialmente hidrolizados.

Tratamiento hidrotérmico

30 En el contexto de la presente invención, la expresión "tratamiento hidrotérmico" se refiere al tratamiento térmico de una suspensión acuosa de lignocelulosa a temperaturas superiores a 50 °C. El tratamiento hidrotérmico se puede llevar a cabo bajo presión en un reactor presurizado o a presión atmosférica en un reactor no presurizado. La presión en el reactor presurizado puede generarse mediante el vapor obtenido del agua cuando se calienta hasta el punto de ebullición o mediante la fase de gas a presión añadida. El tratamiento hidrotérmico se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador o en ausencia de un catalizador. Tratamiento hidrotérmico en ausencia de un catalizador (también denominado "autohidrólisis" o "AH") para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica sin catalizador agregado cuando la suspensión acuosa de biomasa lignocelulósica se somete a tratamiento hidrotérmico a temperaturas superiores a 120 °C bajo presión.

40 "Paja autohidrolizada" se refiere en el presente documento a la fracción sólida que se ha obtenido después de la autohidrólisis. La paja autohidrolizada puede haber sido sometida a lavado.

Tratamiento de deslignificación

45 "Tratamiento de deslignificación" se refiere en el presente documento a un tratamiento que elimina material no hidrato de carbono tal como lignina de la biomasa lignocelulósica. Tratamiento de deslignificación también se refiere a un tratamiento que elimina material no hidrato de carbono e hidrato de carbono como una mezcla de biomasa lignocelulósica.

50 Explosión de vapor

En el contexto de la presente invención, la expresión "explosión de vapor" se refiere a un tratamiento, donde el material se calienta con vapor de alta presión (a temperaturas entre 110 °C y 250 °C, normalmente 140 -230 °C) bajo una presión con o sin la adición de productos químicos (tales como ácidos) y el material se mantiene a la temperatura durante un cierto tiempo después del cual se libera la presión causando una descompresión explosiva del material. En este contexto, la explosión de vapor se aplica a materiales lignocelulósicos y, normalmente, produce una ruptura de la estructura rígida de las fibras de lignocelulosa, es decir, la desfibrilación de los haces de fibras de celulosa.

60 Agente de deslignificación alcalina

En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de deslignificación alcalina" se refiere a un compuesto químico o una mezcla de compuestos químicos que cuando se agregan al agua dan soluciones con una actividad de ión hidrógeno inferior a la del agua pura, es decir, un pH mayor que 7,0. El agente de deslignificación alcalina se puede seleccionar de un grupo de compuestos que comprenden, pero no se limitan a, hidróxidos, tales como LiOH

(hidróxido de litio), NaOH (hidróxido de sodio), KOH (hidróxido de potasio), Ca(OH)₂ (hidróxido de calcio), NH₄OH (hidróxido de amonio) o compuestos que pueden formar iones hidróxido en agua como NH₃ (amoníaco) en estado líquido o gaseoso, carbonatos tales como HCO₃⁻ (ion bicarbonato), Li₂CO₃ (carbonato de litio), Na₂CO₃ (carbonato de sodio), K₂CO₃ (carbonato potásico), sulfuros tales como Na₂S (sulfuro de sodio) y los hidratos correspondientes.

5

Tratamiento de deslignificación alcalina

En el contexto de la presente invención, la expresión "tratamiento de deslignificación alcalina" se refiere al tratamiento de lignocelulosa realizado en presencia de un agente de deslignificación alcalina, pH (pH inicial) normalmente entre 10 y 13. En el tratamiento con deslignificación alcalina, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se puede utilizar en combinación con un agente de deslignificación alcalina.

10

Compuesto catiónico

La expresión "compuesto catiónico" se refiere a uno o más compuestos que comprenden iones catiónicos o mezclas de los mismos que comprenden iones catiónicos. Los compuestos catiónicos incluyen, pero sin limitación, compuestos que comprenden un grupo catiónico tal como un catión de amonio cuaternario. Los compuestos catiónicos que comprenden un catión de amonio cuaternario incluyen, pero sin limitación, polímeros y oligómeros catiónicos, tales como almidón catiónico, amilosa catiónica, amilopectina catiónica, dextrano catiónico, oligómeros de lignina catiónicos, polímeros de lignina catiónicos, turba catiónica o mezclas de los mismos. Los polímeros y oligómeros catiónicos preferentes tienen una densidad de carga catiónica de 0,5 - 5 meq/g. Los compuestos catiónicos incluyen también, compuestos que pueden formar iones catiónicos divalentes o multivalentes, tales como iones Ca²⁺ o Mg²⁺ en agua. Estos compuestos que pueden formar iones catiónicos divalentes o multivalentes incluyen, pero sin limitación, acetatos, bicarbonatos, bromuros, cloruros, formiatos, hidróxidos y nitratos de los iones catiónicos multivalentes. En una realización preferida de la presente invención, el método de fraccionamiento utiliza un almidón catiónico o cloruro de aluminio.

15

20

25

Compuesto oligomérico

Oligómero y compuesto oligomérico se refieren a un compuesto que consiste en menos de 15 unidades monoméricas unidas idénticas o no idénticas.

30

Hidrólisis enzimática

En el contexto de la presente invención, la expresión "hidrólisis enzimática" se refiere al tratamiento enzimático del material lignocelulósico que comprende celulosa y/o hemicelulosa, oligosacáridos, donde las enzimas facilitan la hidrólisis de la celulosa y/o hemicelulosa, oligosacáridos para obtener mono- y/o disacáridos. Normalmente, el tratamiento de hidrólisis enzimática del material lignocelulósico se realiza sometiendo el material lignocelulósico a una mezcla de enzimas en presencia de agua o un tampón. La mezcla de enzimas consiste, normalmente, en, pero no se limita a, 1,4-β-glucanasas (endoglucanasas y exoglucanasas, o endocelulasas y exocelulasas), 1,4-β-glucosidasas (celobiasas) y enzimas que degradan la hemicelulosa (hemicelulasas, xilanasas, arabinasas, etc.).

35

40

Lípido o lípido microbiano

En el contexto de la presente invención, "lípido microbiano", "lípido" o "lípido intracelular" se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula generalmente contiene, como una parte, una cadena de hidrocarburo alifática, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero es poco soluble en agua. Los lípidos son un grupo esencial de moléculas grandes en células vivas. Los lípidos son, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de cera, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides, polihidroxialcanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, aldehídos grasos, ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilgliceroles, tales como triacilgliceroles, diacilgliceroles o monoacilgliceroles. Los lípidos preferidos en la presente invención son grasas, aceites, ceras, acilgliceroles y ácidos grasos y sus derivados, en particular triacilgliceroles y ésteres de cera. En el contexto de la presente invención, los lípidos se sintetizan mediante, y se acumulan en, microbios (lípidos intracelulares). En otra realización de la invención, los lípidos se sintetizan y se excretan mediante microbios (lípidos extracelulares).

45

50

55

En relación con esta invención, se utiliza aceite unicelular como sinónimo de lípidos y grasas.

El término "acilglicerol" se refiere a un éster de glicerol y ácidos grasos. Los acilgliceroles se producen naturalmente como grasas y aceites grasos. Los ejemplos de acilgliceroles incluyen triacilgliceroles (TAG, triglicéridos), diacilgliceroles (diglicéridos) y monoacilgliceroles (monoglicéridos).

60

Azúcar

En el contexto de la presente invención, el término "azúcar" se refiere en el presente documento a hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos. En particular, en esta solicitud, el término azúcar se refiere a

65

hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos solubles en agua procedentes de materiales lignocelulósicos. Por la expresión "azúcares poliméricos" se entiende los hidratos de carbono que están en forma polimérica y no son normalmente solubles en agua.

5 Rendimiento de azúcar

En el contexto de la presente invención, la expresión "rendimiento de azúcar" se refiere, en el presente documento, al rendimiento de hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos a partir de materiales particulares. En particular, en esta solicitud, la expresión rendimiento de azúcar se refiere al rendimiento de hidratos de carbono oligoméricos, diméricos y monoméricos solubles en agua procedentes de materiales lignocelulósicos.

Proceso de producción de aceite unicelular

"Proceso de producción de aceite unicelular" se refiere en el presente documento a un proceso, que comprende las etapas para formar o permitir el crecimiento de un microorganismo sintetizador de lípidos y permitir que la masa del organismo así obtenido produzca y/o almacene (acumule) lípidos, recuperar las células de la fase líquida y extraer o recuperar los lípidos de las células. En determinados casos, el aceite unicelular también puede ser extracelular, tal como excretado o liberado de las células en el medio de cultivo durante o después del cultivo.

20 Cultivo aeróbico

La expresión "cultivo aeróbico" o "fermentación aeróbica" se refiere un cultivo en el que el microorganismo utiliza oxígeno como aceptor de electrones terminal para la generación de energía (es decir, el microorganismo utiliza la respiración aeróbica). Normalmente, en los biorreactores, el cultivo aeróbico se realiza mediante la adición de oxígeno o una mezcla de gases que contiene oxígeno (normalmente aire), es decir, el biorreactor está aireado. Cuando los microorganismos utilizan la respiración aeróbica en el cultivo, puede denominarse "cultivo en condiciones aeróbicas". Normalmente esto ocurre en biorreactores aireados.

Proceso de producción de aceite unicelular

"Proceso de producción de aceite unicelular" se refiere en el presente documento a un proceso, que comprende las etapas para formar o permitir la formación de un microorganismo sintetizador de lípidos y permitir que la masa del organismo así obtenido produzca y/o almacene (acumule) lípidos, recuperar las células de la fase líquida y extraer o recuperar los lípidos de las células. En determinados casos, el aceite unicelular también puede ser extracelular, tal como excretado o liberado de las células en el medio de cultivo durante o después del cultivo.

Microbio oleaginoso o microorganismo productor de aceite

El microbio oleaginoso (también conocido como organismos productores de aceite) utilizado en la presente invención se selecciona del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras y hongos filamentosos, arqueas o microalgas. Los microorganismos pueden acumular fácilmente lípidos o se han modificado genéticamente para acumular lípidos o mejorar la acumulación de lípidos.

Preferentemente se utilizan organismos que son capaces de utilizar los azúcares C6 y C5. Preferentemente, los organismos son levaduras, hongos filamentosos o bacterias.

En el contexto de la presente invención, el microorganismo oleaginoso (microbio oleaginoso) se refiere a un microorganismo que es capaz de acumular lípidos intercelulares de manera que los lípidos acumulan al menos el 15 % (p/p) de la biomasa total (por peso seco celular) del microbio cuando se cultiva en condiciones adecuadas. En una realización preferida, el microbio oleaginoso es capaz de acumular al menos el 20 % (p/p) de la biomasa total del microbio (por peso seco celular).

Las cepas de microorganismos preferidas para los fines de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las especies y géneros enumerados a continuación:

De acuerdo con una realización de la invención, el microbio es un microbio oleaginoso capaz de utilizar azúcares procedentes de materiales lignocelulósicos. Preferentemente, los organismos oleaginosos son capaces de utilizar azúcares C6 (azúcares de seis carbonos, tales como glucosa, manosa y galactosa) y azúcares C5 (tales como xilosa y arabinosa) en hidrolizados lignocelulósicos. De acuerdo con una realización de la invención, el organismo oleaginoso es capaz de utilizar hidratos de carbono poliméricos u oligoméricos en lignocelulosa o fracciones de la misma.

Las cepas fúngicas (filamentosas) preferidas son de especies de los géneros *Aspergillus* tales como *Aspergillus oryzae*, *Mortierella* tales como *Mortierella isabellina*, *Chaetomium*, *Claviceps*, *Cladosporidium*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Futilizarium*, *Glomus*, *Mucor*, *Pseudozyma*, *Pythium*, *Rhizopus*, tales como *Rhizopus oryzae*, *Tremella*, *Zygorhynchus*, *Humicola*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Umbelopsis* tales como *Umbelopsis isabellina* y *Ustilago*. Las especies de hongos más preferidas son de los géneros *Aspergillus* y/o *Mortierella*. Los hongos preferidos son

aquellos hongos capaces de producir eficazmente lípidos.

Las cepas de levadura preferidas son aquellas que pertenecen a especies de géneros, *Geotrichum*, *Deparyomyces*, *Pachysolen*, *Galactomyces*, *Hansenula*, *Leucosporidium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Waltomyces*, ,
 5 *Cryptococcus*, tales como *Cryptococcus curvatus*, *Rhodospiridium*, tales como *Rhodospiridium toruloides* o *Rhodospiridium fluviale*, *Rhodotorula*, tales como *Rhodotorula glutinis*, *Yarrowia*, tales como *Yarrowia lipolytica*, *Candida*, tales como *Candida curvata*, *Lipomyces* tales como *Lipomyces starkeyi* y *Trichosporon* tales como *Trichosporon cutaneum* o *Trichosporon pullulans*. Las levaduras más preferidas son de los géneros *Lipomyces*, *Rhodospiridium* y *Cryptococcus*. Las levaduras preferidas son aquellas levaduras capaces de producir eficazmente
 10 lípidos.

Las bacterias preferidas son aquellas que pertenecen a las especies de los géneros *Rhodococcus*, *Acinetobacter* y *Streptomyces*. Las bacterias preferidas son aquellas bacterias capaces de producir eficazmente lípidos.

15 Las algas más preferidas son microalgas, tales como especies de microalgas de géneros que comprenden, *Brachiomonas*, *Crypthecodinium*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Hantzschia*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Prototheca*, *Scenedesmus*, *Schizochytrium*, *Traustochytrium* y *Ulkenia*. Las microalgas preferidas son aquellas microalgas capaces de crecer heterotróficamente y producir eficazmente lípidos. Los organismos pertenecientes a los géneros *Schizochytrium*, *Traustochytrium* y *Crypthecodinium* y *Ulkenia* se denominan, a veces, hongos marinos.
 20

De acuerdo con otra realización de la invención, los hidratos de carbono de la biomasa lignocelulósica están principalmente en forma monomérica y los organismos que no son capaces de utilizar hidratos de carbono oligoméricos o polímeros se utilizan para la producción de aceite unicelular. Dichos organismos productores de aceite se seleccionan del grupo de bacterias, cianobacterias, hongos tales como levaduras y hongos filamentosos, arqueas o microalgas. Los microorganismos pueden acumular fácilmente lípidos o se han modificado genéticamente para acumular lípidos o mejorar la acumulación de lípidos.
 25

Recuperación de lípidos

30 "Recuperación de aceite" o "Recuperación de lípidos" o "Lípido de recuperación a partir de un microbio oleaginoso" se refiere a un proceso, en el cual el lípido (lípido intracelular) se recupera mediante métodos mecánicos, químicos, termomecánicos o autocatalíticos o mediante una combinación de estos métodos a partir de las células del microorganismo. Como alternativa, "recuperación de aceite" puede significar la recuperación de lípidos producidos extracelularmente del caldo de cultivo (fermentación).
 35

Masa unicelular que contiene lípidos

"Masa unicelular que contiene lípidos" representa una masa unicelular y un micelio celular con un contenido de lípidos de al menos, preferentemente, al menos el 10 %, preferentemente, al menos el 15 % (p/p) o más de materia seca de la biomasa del microorganismo.
 40

Masa celular residual

En el contexto de la presente invención, "masa celular residual" se refiere a una fracción de material sólido, semisólido o que fluye, que contiene microorganismos tratados para la recuperación de lípidos intracelulares.
 45

Biocombustible

En el contexto de la presente invención, "biocombustible" se refiere a combustible sólido, líquido o gaseoso procedente principalmente de biomasa o bio residuos y es diferente de los combustibles fósiles, que proceden de los restos orgánicos de plantas y animales prehistóricos.
 50

De acuerdo con la directiva de la UE 2003/30/EU, "biodiésel" se refiere a un éster metílico producido a partir de aceite vegetal o aceite animal, de calidad diésel para ser utilizado como biocombustible. De manera más amplia, el biodiésel se refiere a los ésteres alquílicos de cadena larga, tales como ésteres de metilo, etilo o propilo, de aceites vegetales o aceites animales de calidad diésel. El biodiésel también se puede producir a partir de lípidos de microorganismos, por lo que los lípidos de microorganismos pueden originarse a partir de una bacteria, un hongo (levadura o moho), un alga u otro microorganismo.
 55

Diésel renovable

"Diésel renovable" se refiere a un combustible producido mediante un tratamiento con hidrógeno de lípidos de origen animal, vegetal o microorganismo, o sus mezclas, por lo que los lípidos de microorganismos pueden originarse a partir de una bacteria, un hongo (levadura o un hongo filamentosos), un alga u otro microorganismo. El diésel renovable también se puede producir a partir de ceras procedentes de la biomasa mediante gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, además del tratamiento con hidrógeno, se pueden realizar isomerizaciones u
 60
 65

otras etapas de procesamiento. El proceso del diésel renovable también se puede utilizar para producir combustible para aviones y/o gasolina. La producción de diésel renovable se ha descrito en las publicaciones de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 y EP1741768.

5 El biodiésel o el diésel renovable pueden mezclarse con combustibles fósiles. Aditivos adecuados, como conservantes y antioxidantes, pueden agregarse al producto combustible.

Lubricante

10 "Lubricante" se refiere a una sustancia, como grasa, lípidos o aceite que reduce la fricción cuando se aplica como recubrimiento de superficie a las partes móviles. Otras dos funciones principales de un lubricante son la eliminación de calor y la disolución de impurezas. Las aplicaciones de los lubricantes incluyen, pero sin limitación, usos en motores de combustión interna como aceites de motor, aditivos en combustibles, en dispositivos impulsados por aceite, como bombas y equipos hidráulicos, o en diferentes tipos de cojinetes. Normalmente, los lubricantes contienen el 75-100 % de aceite base y el resto son aditivos. Aditivos adecuados son, por ejemplo, detergentes, estabilizantes de almacenamiento, antioxidantes, inhibidores de corrosión, deshazadores, demulsionantes, agentes antiespumantes, cosolventes y aditivos de lubricidad (véase, por ejemplo, el documento US 7.691.792). El aceite base para lubricante puede provenir de aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal o de una bacteria, hongo (levadura o un hongo filamentoso), un alga u otro microorganismo. El aceite base también puede provenir de ceras procedentes de la biomasa mediante gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. El índice de viscosidad se utiliza para caracterizar el aceite base. Normalmente, se prefiere un alto índice de viscosidad.

25 Los lípidos producidos de acuerdo con el método descrito en la presente invención se pueden utilizar como materia prima para la producción de biodiésel, diésel renovable, combustible para aviones o gasolina. El biodiésel consiste en ésteres metílicos de ácidos grasos, y se produce, normalmente, mediante transesterificación. En la transesterificación, los acilglicerol se convierten en ésteres de alquilo (metilo, etilo o propilo) de ácidos grasos de cadena larga. El diésel renovable se refiere al combustible producido mediante el tratamiento con hidrógeno (desoxigenación, hidrogenación o hidroprocesamiento del hidrógeno) de los lípidos. En el tratamiento con hidrógeno, los acilglicerol se convierten en alcanos correspondientes (parafinas). Los alcanos (parafinas) se pueden modificar adicionalmente mediante isomerización o mediante otras alternativas de proceso. El proceso del diésel renovable 30 también se puede utilizar para producir combustible para aviones y/o gasolina. Además, el agrietamiento de los lípidos se puede realizar para producir biocombustibles. Además, los lípidos se pueden utilizar como biocombustibles directamente en ciertas aplicaciones.

35 Los lípidos producidos con el método también se pueden utilizar como aceites base para lubricantes (aceites lubricantes) o como material de partida para la producción de aceites base para lubricantes.

Materia seca

40 "DM" o "peso seco" se refiere en el presente documento a materia seca y es una medida de la masa de un material cuando se ha sometido a un tratamiento que, esencialmente, elimina el agua del material (es decir, el material está completamente seco).

Consistencia

45 "Consistencia" se refiere en el presente documento a la relación entre el peso seco de los sólidos y el peso total de la suspensión.

Método para el fraccionamiento de un material lignocelulósico

50 La presente invención proporciona un método para el fraccionamiento de un material lignocelulósico para obtener material de hidratos de carbono celulósico separado a partir de una parte sustancial de la lignina que se ha eliminado. Opcionalmente, el método también proporciona una fracción que comprende azúcares hemicelulósicos. El método proporciona además fracciones de lignina concentrada. La fracción que comprende el material de hidratos de carbono celulósico obtenido a partir del material lignocelulósico se puede utilizar para la preparación de un medio de cultivo para la producción de lípidos microbianos, tal como se describe en el presente documento, opcionalmente, la fracción que comprende el material de hidratos de carbono se combina con una fracción que comprende azúcares hemicelulósicos en un cultivo para la producción de lípidos microbianos.

60 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para el fraccionamiento de un material lignocelulósico, comprendiendo el método

65 a) Someter el material lignocelulósico a un tratamiento de deslignificación en presencia de un agente de deslignificación alcalina para producir una mezcla que comprende una primera fase sólida y una primera fase líquida que contiene lignina disuelta, en donde el agente de deslignificación alcalina se agrega al material lignocelulósico para obtener una suspensión que tiene un pH superior a 7,

b) Separar la primera fase sólida de la primera fase líquida,

c) Introducir un compuesto catiónico en la primera fase líquida para producir una mezcla que comprende una segunda fase sólida y una segunda fase líquida y en donde la segunda fase líquida se separa de la segunda fase sólida y la segunda fase líquida se recicla al paso a),

d) Someter la primera fase sólida a un tratamiento de hidrólisis enzimática en presencia de enzimas capaces de hidrolizar las fracciones de celulosa y hemicelulosa de la primera fase sólida para producir una mezcla que comprende una tercera fase líquida en forma de un hidrolizado enzimático y una tercera fase sólida.

e) Separar la tercera fase líquida de la tercera fase sólida, y en donde el compuesto catiónico se selecciona de un grupo que comprende oligómeros y polímeros catiónicos tales como polisacáridos catiónicos de almidón, amilosa catiónica, amilopectina catiónica, dextrano catiónico, oligómeros de lignina catiónicos, polímeros de lignina catiónicos, turba catiónica, o mezclas de los mismos, o en donde el compuesto catiónico es un ion catiónico elemental seleccionado del grupo que comprende metales alcalinotérreos y cationes bivalentes y trivalentes de hierro (Fe) o aluminio (Al) procedentes de compuestos tales como cloruro de aluminio $AlCl_3$, acetato de bario $Ba(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de bario $Ba(HCO_3)_2$, bromuro de bario $BaBr_2$, cloruro de bario $BaCl_2$, formiato de bario $Ba(HCO_2)_2$, (hidróxido de bario $(Ba(OH)_2)$, nitrato de bario $Ba(NO_3)_2$, acetato de calcio $Ca(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de calcio $Ca(HCO_3)_2$, bromuro de calcio $CaBr_2$, cloruro de calcio $CaCl_2$, formiato de calcio $Ca(HCO_2)_2$, (hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$, nitrato de calcio $Ca(NO_3)_2$, acetato de magnesio $Mg(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de magnesio $Mg(HCO_3)_2$, bromuro de magnesio $MgBr_2$, cloruro de magnesio $MgCl_2$, formiato de magnesio $Mg(HCO_2)_2$, (hidróxido de magnesio $Mg(OH)_2$, nitrato de magnesio $Mg(NO_3)_2$, acetato de hierro $Fe(C_2H_3O_2)_2$, cloruro férrico $FeCl_3$ y los hidratos correspondientes.

Los inventores han descubierto que mediante la combinación de la etapa de deslignificación alcalina con la aplicación posterior de un compuesto catiónico, la lignina solubilizada puede eliminarse permitiendo que la fase líquida del material se recicle sin una etapa de precipitación de la lignina mediante la bajada del pH.

En una realización preferida de la presente invención, la segunda fase líquida se separa de la segunda fase sólida y la segunda fase líquida se recicla a la etapa a). Mediante el reciclado de la segunda fase líquida y, por lo tanto, la realización de una o más rondas de las etapas a) a e), se puede eliminar más lignina de la fase líquida. Por lo tanto, el material puede someterse a dos ciclos repetidos de deslignificación alcalina (lignina solubilizada), seguido de un tratamiento con el compuesto catiónico (eliminar la lignina solubilizada) antes de que los azúcares celulósicos se sometan a hidrólisis enzimática.

Etapas de deslignificación con un agente de deslignificación alcalina

En la etapa a) del método de fraccionamiento del material lignocelulósico, la primera fase sólida (que comprende material lignocelulósico opcionalmente del que se ha eliminado parcialmente el material hemicelulósico) se somete a una etapa de deslignificación alcalina, en la que al menos se solubiliza parte de la lignina. La deslignificación alcalina se realiza mediante el sometimiento del material lignocelulósico (opcionalmente, del que se ha eliminado parcialmente el material hemicelulósico) a un agente de deslignificación alcalina.

El tratamiento con álcali se realiza, normalmente, mediante la preparación de una suspensión que comprende material de lignocelulosa (opcionalmente tratado hidrotérmicamente o autohidrolizado), líquido acuoso y uno o más productos químicos alcalinos, o mezclas de los mismos para dar un pH de la suspensión por encima de pH 7. Preferentemente, se añade una sustancia química alcalina a una cantidad para dar un pH de suspensión entre 10 y 13.

La suspensión alcalina se mantiene a temperaturas donde la suspensión contiene al menos una fase líquida. La incubación no se limita a ninguna temperatura determinada, sino que se puede llevar a cabo en un amplio intervalo de temperatura de manera isotérmica o no isotérmica. La incubación se lleva a cabo preferentemente a temperaturas de 25 °C a 160 °C, más preferentemente de 25 a 120 °C.

La agitación se lleva a cabo opcionalmente para aumentar la eficacia de la transferencia de calor durante la incubación. El tiempo de tratamiento se selecciona de acuerdo con el grado deseado de material de disolución. Preferentemente, el tiempo de tratamiento es de media hora a veinte horas.

Después del tiempo de reacción, la fase líquida y la fase sólida se separan mediante el uso de cualquier método tal como, pero sin limitación, filtración, por ejemplo, filtración por presión o prensa de tornillo. La fase sólida se utiliza para la hidrólisis enzimática para liberar azúcares para su uso posterior, como la producción de aceite microbiano. La fase líquida se puede tratar para precipitar lignina, tal como mediante tratamiento ácido y la lignina precipitada se puede separar mediante cualquier método.

En una realización de la presente invención, el agente de deslignificación alcalina se selecciona de un grupo que consiste en hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido potásico, carbonato de potasio, hidróxido de calcio y

carbonato de calcio, hidróxido de litio, carbonato de litio, hidróxido de amonio, amoniaco, sulfuro de sodio, y los hidratos correspondientes. En una realización preferida, el agente de deslignificación alcalina es hidróxido de sodio. En una realización preferida, el agente de deslignificación alcalina es carbonato de sodio.

- 5 De acuerdo con otra realización más de la invención, la deslignificación del material lignocelulósico se realiza con amonio como producto químico de deslignificación.
De acuerdo con una realización de la invención, expansión de fibra de amonio (AFEX) o amoniaco.

10 Como se ha mencionado anteriormente, los inventores han descubierto sorprendentemente que la deslignificación alcalina se puede realizar eficazmente sin la aplicación excesiva de agente de deslignificación alcalina si el material lignocelulósico se somete a un tratamiento hidrotérmico, tal como autohidrólisis, antes de la deslignificación alcalina. El tratamiento hidrotérmico da como resultado una acidez disminuida de la fracción sólida (que comprende celulosa, lignina y hemicelulosa residual). Por lo tanto, en la etapa de deslignificación alcalina se necesita menos agente
15 alcalino en comparación con la situación cuando no se realiza un tratamiento hidrotérmico. Por lo tanto, el tratamiento alcalino después del tratamiento hidrotérmico se puede realizar a un pH más bajo en comparación con la situación sin autohidrólisis. Por lo tanto, el tratamiento hidrotérmico es beneficioso antes del tratamiento alcalino del material lignocelulósico. Una ventaja de aplicar cantidades más bajas del agente de deslignificación alcalina es que se pierde menos azúcar en la etapa de deslignificación alcalina en comparación con un tratamiento similar realizado en presencia de altas cantidades del agente de deslignificación alcalina.

20 Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, la concentración de agente de deslignificación es de 0,1 a 10 % en peso, más preferentemente 0,1 - 4 % en peso basado en la cantidad de material lignocelulósico basada en la materia seca. En una realización adicional, el agente de deslignificación alcalina se agrega al material lignocelulósico para obtener una suspensión que tiene un pH superior a 7, preferentemente entre
25 10 y 13.

En una realización adicional, el tratamiento de deslignificación se lleva a cabo a una temperatura superior a 25 °C, preferentemente entre 30 y 160 °C.

30 **Etapas de recuperación de lignina utilizando un compuesto catiónico**

En la etapa b) del método para el fraccionamiento del material lignocelulósico, el líquido obtenido a partir del producto de la deslignificación alcalina (mediante la separación de la mezcla de la primera fase sólida y la primera fase líquida) se somete a un tratamiento con un compuesto catiónico para eliminar la lignina del material. El
35 compuesto catiónico captura la lignina solubilizada en la fase líquida (primera fase líquida) obtenida de la separación del producto de la deslignificación alcalina.

El líquido de deslignificación alcalina obtenido a partir del tratamiento de deslignificación alcalina comprende material orgánico e inorgánico tal como lignina y otro material soluble en álcali. Dicha solución alcalina (líquido de deslignificación alcalina) tiene una acidez de $7 > \text{pH} < 14$. Se añaden uno o más compuestos catiónicos a la solución alcalina en dosis suficientes para precipitar el material orgánico previamente soluble. Por consiguiente, la precipitación se logra sin acidificación de la solución alcalina, de modo que el pH de la solución alcalina permanece esencialmente sin cambios.

45 La fracción sólida precipitada se separa de la solución alcalina mediante medios convencionales, lo que produce una "solución alcalina clarificada" y una fracción sólida precipitada que comprende material orgánico precipitado y la sustancia catiónica. La fracción sólida precipitada se puede utilizar como tal o tratarse adicionalmente para recuperar las sustancias catiónicas. Preferentemente, la lignina separada se puede utilizar para aplicaciones de valor agregado en comparación con el valor de combustión. Opcionalmente, la fracción de lignina separada se lava.

50 La solución alcalina clarificada se recicla a la etapa de tratamiento alcalino, y el líquido de deslignificación alcalina producido se precipita nuevamente como se describe anteriormente. Opcionalmente, la solución alcalina clarificada se mezcla con líquido y/o álcali fresco para reemplazar las cantidades consumidas en el tratamiento alcalino. El proceso se repite hasta que el líquido de deslignificación alcalina se satura con sustancias no precipitadas.

55 En una realización de la presente invención, el compuesto catiónico se selecciona de un grupo que comprende polímeros y oligómeros catiónicos tales como polisacáridos catiónicos de almidón, amilosa catiónica, amilopectina catiónica, dextrano catiónico, oligómeros de lignina catiónicos, polímeros de lignina catiónicos, turba catiónica o mezclas de los mismos. En otra realización preferida, el compuesto catiónico es un polímero de almidón catiónico.

60 En una realización adicional, los polímeros y oligómeros catiónicos tienen una densidad de carga catiónica de 0,5 - 5 meq/g.

65 En una realización, el compuesto catiónico es un ión catiónico elemental seleccionado del grupo que comprende metales alcalinotérreos y cationes bivalentes y trivalentes de hierro (Fe). En otra realización, el ion catiónico puede proceder de compuestos tales como cloruro de aluminio AlCl_3 , acetato de bario $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, bicarbonato de bario

5 Ba(HCO₃)₂, bromuro de bario BaBr₂, cloruro de bario BaCl₂, formiato de bario Ba(HCO₂)₂, (hidróxido de bario (Ba(OH)₂), nitrato de bario Ba(NO₃)₂, acetato de calcio Ca(C₂H₃O₂)₂, bicarbonato de calcio Ca(HCO₃)₂, bromuro de calcio CaBr₂, cloruro de calcio CaCl₂, formiato de calcio Ca(HCO₂)₂, (hidróxido de calcio Ca(OH)₂), nitrato de calcio Ca(NO₃)₂, acetato de magnesio Mg(C₂H₃O₂)₂, bicarbonato de magnesio Mg(HCO₃)₂, bromuro de magnesio MgBr₂, cloruro de magnesio MgCl₂, formiato de magnesio Mg(HCO₂)₂, (hidróxido de magnesio Mg(OH)₂), nitrato de magnesio Mg(NO₃)₂, acetato de hierro Fe(C₂H₃O₂)₂, cloruro férrico FeCl₃ y los hidratos correspondientes. En una realización preferida, la cantidad de compuesto catiónico es de 0,001 a 0,25 g/g basada en el contenido de materia seca de la primera fase líquida. En otra realización preferida, el compuesto catiónico es cloruro de aluminio.

10 En una realización de la presente invención, se utiliza una mezcla de compuestos catiónicos por el método, tal como una mezcla de polímeros catiónicos, una mezcla de iones catiónicos o una mezcla de ión catiónico y polímeros catiónicos, tal como una mezcla de compuesto catiónico, en donde la mezcla comprende o consiste en un polímero de almidón catiónico y cloruro de aluminio.

15 Por lo tanto, como se ha mencionado anteriormente, la segunda fase líquida que aún contiene hidratos de carbono puede así reciclarse e introducirse en la etapa a) y someterse a otra ronda de etapa de deslignificación alcalina opcionalmente seguida por un tratamiento con un compuesto catiónico (como se ilustra en la Figura 1). El reciclado de la segunda fase líquida puede realizarse sin la necesaria adición del agente de deslignificación alcalina, a diferencia de la situación en la que la lignina solubilizada se precipitó con ácido en lugar de la aplicación de un
20 compuesto catiónico.

Por lo tanto, en una realización adicional, la segunda fase líquida se separa de la segunda fase sólida y la segunda fase líquida se recicla a la etapa a).

25 De acuerdo con la invención, la lignina se puede precipitar a partir del líquido de deslignificación alcalina sin cambio de pH mediante compuestos catiónicos y el líquido de deslignificación alcalina clarificado (después de la eliminación) del precipitado de lignina se puede reciclar a la etapa de deslignificación alcalina. Esto es beneficioso, ya que la cantidad de agente alcalino (fresco) de relleno para el tratamiento alcalino es menor en comparación con un caso en el que los compuestos ácidos tienen que disminuir el pH para la recuperación de lignina.

30 **Etapla opcional de eliminar parcialmente los azúcares hemicelulósicos del material lignocelulósico antes de la deslignificación alcalina**

35 El método para el fraccionamiento del material lignocelulósico puede incluir opcionalmente una etapa en la que la hemicelulosa se elimina al menos parcialmente del material lignocelulósico para producir una fase líquida que comprende la hemicelulosa y la fase sólida del material lignocelulósico, que se introduce en la etapa a) del método (como se ilustra en la Figura 2).

40 Por lo tanto, en una realización, el material lignocelulósico se somete a un tratamiento, en el que la hemicelulosa eliminada al menos parcialmente del material lignocelulósico como un material lignocelulósico hidrolizado de hemicelulosa acuosa se somete a la etapa a). En una realización adicional, al menos parte del hidrolizado hemicelulósico acuoso se combina con la primera fase sólida y se somete a un tratamiento de hidrólisis enzimática.

45 En esta etapa opcional del método de fraccionamiento, las hemicelulosas se disuelven al menos parcialmente y se separan en una fase líquida que comprende las hemicelulosas.

50 Se deduce que el hidrolizado de lignocelulosa obtenido mediante el método de la presente invención se puede obtener mediante uno o más tratamientos de la lignocelulosa o material lignocelulósico, incluida la hidrólisis (tratamiento hidrotérmico y/o autohidrólisis), explosión de vapor con o sin adición de ácidos, una o más etapas de deslignificación, antes de que el material lignocelulósico se someta al agente de deslignificación alcalina en la etapa de deslignificación alcalina.

55 En una realización de la presente invención, la hemicelulosa se elimina al menos parcialmente del material lignocelulósico mediante tratamiento hidrotérmico. En una segunda realización, el tratamiento hidrotérmico se lleva a cabo a una temperatura de entre 100 y 250 °C, preferentemente entre 140 y 240 °C, y lo más preferentemente entre 140 y 200 °C. La intensificación del tratamiento hidrotérmico puede expresarse en términos de gravedad, el término que se define en el presente documento. En una realización preferida, el tratamiento hidrotérmico se lleva a cabo en condiciones correspondientes a una gravedad de entre 2,0 y 4,5, más preferentemente entre 3,0 y 4,1, y más preferentemente entre 3,5 y 4,0.

60 En otra realización de la presente invención, la hemicelulosa se elimina al menos parcialmente del material lignocelulósico mediante tratamiento de autohidrólisis. La autohidrólisis se realiza normalmente con un contenido de materia seca del 5 al 60 %, a temperaturas entre 140 y 240 °C durante 1-120 minutos sin la adición de compuestos ácidos, lo que da como resultado una solución del 5 al 40 % del contenido de materia seca en material
65 lignocelulósico, incluidos los hidratos de carbono hemicelulósicos. Normalmente, la autohidrólisis disuelve del 30 al 100 % de los hidratos de carbono hemicelulósicos del material lignocelulósico, preferentemente más > 50 %, más

preferentemente > 70 %, más preferentemente > 80 %, incluso más preferentemente > 90 %. Los hidratos de carbono de hemicelulosa disueltos están al menos parcialmente en forma oligomérica. Más normalmente, la autohidrólisis se realiza a un contenido de materia seca del 10-50 % a 160-220 °C, dependiendo de la materia prima lignocelulósica. Después de la autohidrólisis, las fases sólida y líquida se separan mediante cualquier método, tal como filtración, por ejemplo, filtración a presión, o mediante una prensa de tornillo. La fracción sólida se puede lavar para eliminar la hemicelulosa disuelta de la fase sólida.

De acuerdo con otra realización más de la invención, el material lignocelulósico se somete a un vapor o explosión de vapor con o sin adición de compuestos ácidos, en general a temperaturas entre 110 y 250 °C, más normalmente a temperaturas entre 140 y 230 °C. El tratamiento da como resultado la solución de hidratos de carbono hemicelulósicos. Opcionalmente, el material sólido de la explosión de vapor se lava para recuperar los hidratos de carbono hemicelulósicos disueltos.

En una realización, el material lignocelulósico, del cual se elimina al menos parte de la hemicelulosa, se somete a una explosión de vapor antes de que se introduzca en la etapa a). En otra realización de la presente invención, el material lignocelulósico se somete primero a un tratamiento hidrotérmico seguido de una etapa de explosión de vapor. En otra realización, la fase sólida obtenida del tratamiento hidrotérmico y/o autohidrólisis se somete a una explosión de vapor antes del tratamiento de deslignificación en presencia del agente de deslignificación alcalina.

De acuerdo con la invención, se descubrió sorprendentemente que el método de tratamiento con lignocelulosa que incluye ambas etapas de tratamiento donde los azúcares hemicelulósicos se disuelven al menos parcialmente (como la autohidrólisis) y la etapa de tratamiento de la deslignificación alcalina (como el tratamiento con NaOH) permite un alto rendimiento global (total) de azúcar en el proceso. El alto rendimiento global de azúcar es beneficioso para la rentabilidad de los procesos microbianos, como la producción de aceite unicelular.

Hidrólisis enzimática del producto de deslignificación

En la etapa d) del método de fraccionamiento del material lignocelulósico, la primera fase sólida obtenida de la etapa de fraccionamiento utilizando un compuesto catiónico se somete además a hidrólisis enzimática. En una realización alternativa, donde la parte sustancial de la lignina se ha eliminado mediante etapas repetidas de deslignificación alcalina y posterior tratamiento con compuestos catiónicos, la segunda fase líquida se puede utilizar en una hidrólisis enzimática para obtener la tercera fase líquida que comprende los azúcares celulósicos.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática consiste en la incubación de paja pretratada u otro sustrato o materia prima, con una mezcla de enzimas, que generalmente consiste en, pero no se limita a, 1,4-β-glucanasas (endoglucanasas y exoglucanasas, o endocelulasas y exocelulasas), 1,4-β-glucosidasas (celobiasas) y enzimas que degradan la hemicelulosa (hemicelulasas, xilanasas, arabinasas, etc.). Las enzimas pueden o no ser productos enzimáticos comerciales. El material de lignocelulosa fraccionada (pretratada) se mezcla con agua o solución tampón y la mezcla de enzimas en las proporciones apropiadas. Los aditivos, tales como polietilenglicol, detergentes u otros agentes tensioactivos o proteínas pueden agregarse o no a la reacción. Se puede utilizar cualquier proporción de sólidos en la suspensión (o "consistencia), preferentemente 10-35 %, o particularmente 15-25 %. El pH de la emulsión se ajusta de acuerdo con las condiciones óptimas para la mezcla de enzimas utilizada. El ajuste del pH se realiza antes y/o durante la adición de enzimas mediante la adición de un ácido o base a una concentración adecuada, por ejemplo, H₂SO₄, HCl, HNO₃, NaOH, NH₃ u otro ácido o base. Un ajuste adicional del pH puede o no realizarse después de la adición de enzimas y durante la hidrólisis.

Una temperatura constante se mantiene durante la hidrólisis, de acuerdo con las condiciones óptimas de la mezcla de enzimas, a menudo 40-60 °C, o particularmente 50 °C. La paja pretratada, el agua y/o la solución tampón y otros componentes de la suspensión de hidrólisis pueden o no precalentarse a la temperatura de reacción antes de agregarse a la suspensión. La suspensión se agita durante la reacción mediante agitación, sacudidas, caída libre o mediante otros medios de agitación.

En una realización de la presente invención, el tratamiento de hidrólisis enzimática del material lignocelulósico se lleva a cabo sometiendo el material lignocelulósico a una mezcla de enzimas en presencia de agua o un tampón. La mezcla de enzimas consiste, normalmente, en, pero no se limita a, 1,4-β-glucanasas (endoglucanasas y exoglucanasas, o endocelulasas y exocelulasas), 1,4-β-glucosidasas (celobiasas) y enzimas que degradan la hemicelulosa (hemicelulasas, xilanasas, arabinasas, etc.).

Mediante el sometimiento de la primera fase sólida obtenida de la etapa de deslignificación alcalina a hidrólisis enzimática, se elimina más lignina del material en forma de lignina sólida (tercera fase sólida). La fase líquida obtenida de la hidrólisis enzimática comprende las liberaciones de azúcares del material. La tercera fase líquida también se conoce como el hidrolizado enzimático, que se puede utilizar para la producción de lípidos microbianos.

Parte de los azúcares hemicelulósicos, que se separan opcionalmente del material, por ejemplo, mediante

tratamiento hidrotérmico o autohidrólisis, pueden introducirse en el sistema y someterse a hidrólisis enzimática junto con el material en fase sólida obtenido a partir de la etapa de deslignificación alcalina.

5 Por lo tanto, al menos parte de la hemicelulosa separada (fase líquida) se puede agregar y mezclar con la fase sólida de la etapa de deslignificación alcalina (la primera fase sólida) antes de que esta mezcla se someta al tratamiento de hidrólisis enzimática de la etapa d). Por lo tanto, en una realización de la invención, al menos parte de la primera fase líquida se combina con la segunda fase sólida y se somete a tratamiento de hidrólisis enzimática.

10 En una realización, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo como una hidrólisis discontinua.

Hidrólisis discontinua

15 La hidrólisis discontinua se refiere a una reacción de hidrólisis, donde los componentes de la reacción se mezclan para formar una suspensión o una emulsión o una pasta, y se incuban durante un período de tiempo apropiado, después de lo cual los sólidos se separan mediante filtración, centrifugación u otros medios de separación y se adquiere una corriente líquida de azúcares solubles, que incluyen glucosa, xilosa arabinosa, galactosa, manosa y otros, y oligómeros de los mismos. Los componentes de la reacción u otras sustancias pueden o no agregarse durante la reacción. Sin embargo, no se separa ninguna corriente líquida de la emulsión antes del final de la reacción.

20 Una reacción discontinua también se puede realizar como un proceso continuo. En una hidrólisis discontinua continua, se alimenta al reactor una corriente constante de paja pretratada, líquido, enzimas, agentes de ajuste del pH y otros componentes de la reacción, mientras que al mismo tiempo se elimina del reactor una corriente constante de emulsión, de la cual se separa la corriente líquida. En una hidrólisis discontinua continua, el reactor puede o no subdividirse en dos o más reactores en serie, a través de los cuales la emulsión fluye constantemente, particularmente para mejorar la distribución del tiempo de retención de la materia prima. Conceptualmente, el material sólido se separa del líquido solo después de la reacción y no tiene lugar ninguna separación durante la reacción. Por lo tanto, no tiene lugar ninguna separación para la emulsión de salida de otros reactores, excepto la emulsión del último reactor y, por consiguiente, no se elimina de la emulsión otra corriente de líquido separada, que la corriente de líquido de la separación de la emulsión de salida final. Sin embargo, la alimentación adicional de los componentes de la reacción puede tener lugar en cualquier punto del proceso. Si la separación del líquido tiene lugar entre dos reactores, los reactores deben definirse como etapas de reacción separadas y el proceso de hidrólisis debe definirse como una hidrólisis secuencial (por etapas).

35 En una segunda realización de la presente invención, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo como una hidrólisis secuencial.

Hidrólisis secuencial

40 La hidrólisis secuencial, también conocida como hidrólisis por etapas, o hidrólisis en dos etapas, en tres etapas o en varias etapas, etc., consiste en una secuencia de reacciones discontinuas en serie, donde, entre las reacciones discontinuas, se separa una corriente líquida de la emulsión y la corriente sólida concentrada se alimenta a la siguiente reacción discontinua y se mezcla con agua dulce y/o solución tampón. La adición de enzimas frescas y otros componentes de la reacción puede o no tener lugar en la segunda, tercera o última reacción. El tiempo de reacción puede ser igual o diferente en las etapas de reacción subsiguientes.

50 De manera similar a como se describe para reacciones discontinuas, la hidrólisis secuencial se puede realizar como un proceso continuo y las etapas de reacción individuales de la hidrólisis secuencial se pueden subdividir en reactores separados en serie, a través de los cuales la emulsión fluye constantemente. La separación de líquido y la adición de líquido fresco pueden o no tener lugar entre los reactores. Conceptualmente, si el líquido se separa y el líquido se reemplaza o no por líquido fresco entre dos reactores, los reactores deben definirse como etapas de reacción separadas.

55 Aún en otra realización, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo como una hidrólisis de reciclado de sólidos.

Reciclado de sólidos residuales en hidrólisis enzimática (o "reciclado de sólidos")

60 Un proceso de hidrólisis con el reciclado de los sólidos residuales, o "reciclado de sólidos", incluye una reacción de hidrólisis, después de la cual una corriente líquida se separa de la emulsión y una proporción de la corriente sólida concentrada se recicla al mismo reactor (Figura 5). La proporción de sólidos residuales reciclados se denomina tasa de reciclado y se denota con r en la Figura 5 y en la Ec. 2 & 3. A una velocidad de alimentación de materia prima constante, el reciclado de sólidos extiende el tiempo de reacción del material sólido de acuerdo con una serie geométrica, presentada en la Ec. 2, donde t_n es el tiempo de reacción promedio de los sólidos después de n reacciones de reciclado posteriores, t_0 es el tiempo de reacción de una sola reacción, o el tiempo de retención de la emulsión en el reactor, y r es la velocidad de reciclado. Eventualmente, un proceso de reciclado a velocidades de alimentación y reciclado constantes y un tiempo de retención constante alcanzará una situación de equilibrio, en el

que el tiempo de reacción promedio del material sólido se puede calcular a partir de la Ec. 3.

$$t_n = \sum_{i=0}^{n-1} t_0 r^i = t_0 \frac{1 - r^n}{1 - r} \quad (2)$$

$$t_{estánd} = \sum_{i=0}^{\infty} t_0 r^i = \frac{t_0}{1 - r} \quad (3)$$

5 Por ejemplo, una velocidad de reciclado del 50 % en una reacción de 24 h, el tiempo de reacción promedio de los sólidos será de 48 horas en situación de equilibrio.

10 La reacción de reciclado se puede realizar como una reacción discontinua, después de la cual tiene lugar el reciclado de sólidos, o como un proceso continuo, donde los componentes del proceso se alimentan constantemente al reactor, produciéndose un flujo constante de salida de la emulsión y la emulsión de salida se separa para un líquido y una corriente concentrada de sólido residual y un flujo constante de sólidos residuales se reciclan de nuevo al reactor. La reacción de reciclado puede o no subdividirse en reactores separados en serie para mejorar la distribución del tiempo de residencia y la separación del líquido desde o después de estos reactores y la alimentación adicional de los componentes del proceso en estos reactores puede o no tener lugar. Se pueden incluir o no etapas adicionales de reacción secuencial después o antes o durante la reacción de reciclado de sólidos.

15 El material hemicelulósico obtenido opcionalmente sometiendo el material lignocelulósico a un tratamiento hidrotérmico o autohidrólisis puede reintroducirse (al menos parcialmente) en la etapa de hidrólisis enzimática. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, al menos parte del hidrolizado hemicelulósico acuoso se combina con la primera fase sólida y se somete al tratamiento de hidrólisis enzimática.

20 El hidrolizado enzimático líquido obtenido en la etapa d) puede someterse a una etapa de concentración del hidrolizado para obtener un hidrolizado concentrado, tal como mediante evaporación, para obtener una fracción que tenga una mayor concentración de hidratos de carbono celulósicos.

25 Por lo tanto, en una realización, el método de acuerdo con la invención incluye además comprender una etapa de concentración de la tercera fase líquida. Preferentemente, la concentración de la tercera fase líquida se realiza mediante evaporación.

30 **Hidrolizado enzimático líquido (tercera fase líquida)**

La fase líquida (el hidrolizado enzimático) obtenida en la etapa d) del método de la invención comprende la liberación de azúcares del material de partida proporcionado en la etapa a) del método o en la etapa de tratamiento hidrotérmico y/o autohidrólisis previa opcional del método. La fase líquida que comprende los azúcares se puede utilizar en la preparación de un medio de cultivo, tal como el cultivo para su uso en un método para producir lípidos microbianos como se describe en el presente documento.

35 Por consiguiente, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una fase líquida en forma de un hidrolizado enzimático obtenible mediante el método de la presente invención (la tercera fase líquida).

40 Como alternativa, la fase líquida del hidrolizado enzimático se puede concentrar para obtener el líquido que tiene una mayor concentración de azúcares. Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona un hidrolizado de azúcar concentrado obtenible mediante el método de la presente invención.

45 El hidrolizado hemicelulósico de la primera fase líquida (que comprende monómeros de azúcar hemicelulósicos) y el hidrolizado enzimático, la tercera fase líquida (que comprende azúcares celulósicos) se pueden utilizar en caldo de cultivo solo o mezclado como fuentes de carbono para la producción de aceite unicelular.

50 La expresión "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento pretende mediante el solicitante que esté opcionalmente sustituido con los términos "que consiste en", "consisten en" o "consiste en", respectivamente, en cada caso.

55 **Ejemplos**

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

60 **Autohidrólisis (con pH pre-ajustado) de paja de trigo**

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 20 g de paja de trigo previamente molida para pasar una malla de 1 mm y 180 g de agua. La suspensión se ajustó con ácido acético a pH 4,5. La suspensión se transfirió a un reactor autoclave que luego se calentó de forma no isotérmica con una camisa de calentamiento a una temperatura entre 170 °C y 200 °C con agitación continua. Los datos de temperatura durante el calentamiento se registraron y se utilizaron para calcular la gravedad de la autohidrólisis (Ec. 1). El reactor se enfrió a aproximadamente 50 °C y la suspensión se recuperó manualmente para la filtración. La fracción líquida se separó de la fracción sólida y se midieron el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF) en la fracción líquida utilizando HPLC. La concentración total de azúcar (g/l) en la fracción líquida se determinó después de una hidrólisis ácida diluida que convierte los azúcares oligoméricos y polímeros en monosacáridos. La fracción sólida se lavó con agua (0,5 dm³) y se prensó. El residuo sólido obtenido se pesó, se tomó una muestra para determinar la materia seca y se calculó el rendimiento del residuo sólido (%) como la relación en peso del residuo sólido a la paja de trigo pesada al tratamiento de autohidrólisis (100 %*g de paja de trigo seco/g de residuo sólido seco). Las sustancias fenólicas solubles en el líquido se determinaron utilizando el método de Folin-Ciocalteu con guayacol como estándar.

Los resultados mostrados en la Figura 15 y la Figura 16 resumen los resultados. El rendimiento del residuo sólido disminuyó con la gravedad de la autohidrólisis con un rendimiento del 67 % en la gravedad más alta (Log (R0) = 4,4) (Figura 15). La concentración de azúcares de monosacáridos en la fracción líquida primero aumentó y luego disminuyó al aumentar la gravedad de la autohidrólisis. La concentración máxima de azúcar (23,1 g/l) se obtuvo cuando la gravedad de la autohidrólisis fue Log (R0) = 3,8. Más allá de esta gravedad de autohidrólisis, la concentración de azúcar en la fracción líquida disminuyó notablemente y la concentración de furfural y HMF aumentó repentinamente, alcanzando una concentración de 4,8 g/l y 0,3 g/l, respectivamente. En contraste con la generación repentina de furfural y HMF, la concentración de compuestos fenólicos solubles aumentó progresivamente desde 0,5 g/l hasta 2,0 g/l con el aumento de la gravedad de la autohidrólisis.

Este ejemplo muestra que las condiciones óptimas de autohidrólisis en términos de gravedad de autohidrólisis (Log(R0)) se pueden seleccionar para evitar la formación excesiva de furfural, HMF y compuestos fenólicos solubles mientras se maximiza la concentración de monosacáridos en la fracción líquida.

30 Ejemplo 2

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 33,8 kg de paja de trigo picada que contenía un 11 % de humedad con 350 kg de agua del grifo, con una consistencia del 8,5 %. La suspensión se calentó hasta aproximadamente 60 °C y la fracción líquida se separó de los sólidos mediante filtración en un filtro Nutsche agitado. La fracción sólida (31,2 kg de materia seca) se mezcló con agua para dar 192,4 kg de suspensión con una consistencia del 5 %. La suspensión se calentó a 180 °C y se enfrió a temperatura ambiente, con una gravedad de S = 4,15. La fracción sólida se separó de la fracción líquida en una centrífuga decantadora. La fracción sólida se lavó con agua y la fracción insoluble lavada, "paja autohidrolizada", (15,3 kg de materia seca) se recuperó utilizando la centrífuga decantadora y se almacenó en el congelador. Basándose en un análisis de HPLC, la fracción líquida (6,3 kg de materia seca) contenía en azúcares procedentes de hemicelulosa aproximadamente la mitad de su materia seca.

La separación de la fracción líquida y sólida y el lavado opcional de la fracción sólida separan las sustancias fenólicas solubles y los ácidos orgánicos liberados en la autohidrólisis de la fracción sólida autohidrolizada. Como resultado, el consumo de producto químico de deslignificación alcalina en la etapa de deslignificación posterior disminuye sinérgicamente.

El ejemplo muestra que la autohidrólisis permite la separación de azúcares hemicelulósicos del material lignocelulósico antes de otros tratamientos de hidrólisis. La fracción sólida producida a partir de este experimento se utilizó posteriormente en las pruebas de deslignificación, que dieron como resultado una fracción sólida con bajo contenido de lignina y alto contenido de hidratos de carbono.

Ejemplo 3

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 10,5 kg de paja molida al 7,3 % de humedad y 54,1 kg de agua del grifo en un recipiente de 100 dm³. Después de almacenar a temperatura ambiente durante 18 h, se pesaron 64,2 kg de la suspensión en un reactor de autoclave agitado cilíndrico horizontal de 250 dm³. El reactor se cerró y se calentó durante 75 min a 140 °C, se mantuvo a 140 °C durante 5 horas y se enfrió a temperatura ambiente durante 30 min. La suspensión tratada hidrotérmicamente se eliminó del reactor, y las fracciones líquida y sólida se separaron mediante filtración. La fracción sólida se lavó con agua del grifo y se prensó utilizando una prensa hídrica. La fracción sólida prensada (20,9 kg) tenía un contenido de materia seca del 42,7 %.

La fracción sólida producida a partir de este experimento se utilizó posteriormente en las pruebas de deslignificación, que dieron como resultado una fracción sólida con bajo contenido de lignina y alto contenido de hidratos de carbono.

Deslignificación de la paja autohidrolizada

La paja autohidrolizada contiene cantidades considerables de lignina que causa efectos inhibidores en la hidrólisis enzimática. Por esta razón, el material sólido de la autohidrólisis se extrae en condiciones alcalinas para eliminar la lignina antes de la hidrólisis enzimática.

5

Ejemplo 4

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 20,5 kg (8 kg de materia seca) de paja autohidrolizada del Ejemplo 2 con 262 g de NaOH granular y agua del grifo en un reactor de acero inoxidable de 180 dm³ equipado con una unidad de agitación. La suspensión con una consistencia del 6,6 % se trató mediante el calentamiento del reactor a 95 °C en 30 min, seguido de un tratamiento isotérmico a 95 °C durante 1 hora con agitación continua. La fracción sólida extraída se separó de la fracción líquida mediante filtración en una centrífuga, se lavó con agua del grifo, se prensó y la paja AH extraída con NaOH (23,64 kg, 27 % de contenido de materia seca) se almacenó a 6 °C. La fracción líquida ("solución de deslignificación con NaOH") que contenía 1,62 kg de material disuelto a partir de paja autohidrolizada se almacenó a 6 °C.

10

15

La hidrólisis enzimática de la paja AH extraída con NaOH con una dosis de enzima de 35 µl/g de Flashzyme Plus (Roal Oy, Finlandia), que fue igual a 6 FPU (unidad de papel de filtro)/g de DM de la actividad celulasa, dio un 65,0 % de rendimiento de azúcar a partir de hidratos de carbono de paja autohidrolizada. Este es un resultado mejorado en comparación con el 61,0 % de rendimiento de azúcar a partir de hidratos de carbono de paja autohidrolizadas sin deslignificación.

20

El rendimiento de azúcar se calcula como la relación entre la cantidad total de monosacáridos liberados en la hidrólisis enzimática de paja AH extraída con NaOH y la cantidad total de monosacáridos liberados de un peso similar de paja AH en hidrólisis ácida multiplicada con el rendimiento de materia seca de paja AH extraída con NaOH a partir del tratamiento de deslignificación.

25

Este ejemplo muestra que la misma cantidad de enzima produce un mayor rendimiento de azúcar en hidrólisis enzimática, cuando la lignina se elimina antes de la hidrólisis enzimática mediante tratamiento alcalino (NaOH). El ejemplo también muestra que parte de la lignina se disuelve en una fracción líquida alcalina y que la lignina se puede recuperar mediante precipitación.

30

Ejemplo 5

Se preparó una suspensión con una consistencia del 3,6 % mediante la mezcla de paja autohidrolizada del Ejemplo 2 (403 g, 156 g de materia seca) con 4050 g de agua del grifo y 37,5 g de Na₂CO₃ sólido en un reactor de vidrio equipado con un agitador magnético. El reactor se calentó hasta 95-100 °C en 30 min y se trató durante 4 horas a 95-100 °C con agitación continua de la suspensión. Se separaron 812 g de la fracción sólida extraída con Na₂CO₃ ("paja AH extraída con Na₂CO₃") con un contenido de materia seca del 15 %, se separaron de la fracción líquida (3325 g) mediante filtración, se lavaron con agua del grifo, se prensaron y almacenaron a 6 °C. El rendimiento de la fracción sólida (DM de paja deslignificada/DM de paja autohidrolizada) fue del 78 %.

35

40

La fracción líquida (solución de deslignificación con Na₂CO₃) tenía un pH de 9,8 y se almacenó a 6 °C. La cantidad de carbonato utilizado es más alta que el NaOH ya que el carbonato es una base más débil que el hidróxido.

45

La hidrólisis enzimática de la paja AH extraída con Na₂CO₃ con una dosis de enzima de 35 µl/g de Flashzyme Plus (Roal Oy, Finlandia), que fue igual a 6 FPU (unidad de papel de filtro)/g de DM de la actividad celulasa, dio un 59,1 % de rendimiento de azúcar a partir de hidratos de carbono de paja autohidrolizada. Este fue un rendimiento de azúcar inferior al 65,0 % con paja AH extraída con NaOH a partir de hidratos de carbono de paja autohidrolizada o un rendimiento de azúcar del 61,0 % a partir de hidratos de carbono de paja autohidrolizada sin deslignificación.

50

El rendimiento de azúcar se calcula como la relación entre la cantidad total de monosacáridos liberados en la hidrólisis enzimática y la cantidad total de monosacáridos liberados de un peso similar de paja AH en hidrólisis ácida multiplicada con el rendimiento de materia seca de paja AH extraída con Na₂CO₃ a partir del tratamiento de deslignificación.

55

En comparación con la paja autohidrolizada que se sometió a hidrólisis enzimática sin deslignificación, la ventaja de la deslignificación con Na₂CO₃ fue que se obtuvo una fracción de lignina adicional (solución de deslignificación con Na₂CO₃).

60

Este ejemplo muestra que la misma cantidad de enzima produce un mayor rendimiento de azúcar en hidrólisis enzimática, cuando la lignina se elimina antes de la hidrólisis enzimática mediante tratamiento alcalino (Na₂CO₃). El ejemplo también muestra que parte de la lignina se disuelve en una fracción líquida alcalina y que la lignina se puede recuperar mediante precipitación.

65

Ejemplo 6

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 10,0 kg (4,41 kg de materia seca) de paja autohidrolizada del Ejemplo 3 con agua del grifo (29,5 kg) y 3,401 g de NaOH acuoso al 50 % (p/p). La suspensión se trató en un reactor y condiciones térmicas similares a las descritas anteriormente en el Ejemplo 3. La fracción sólida ("paja deslignificada con NaOH"), se separó mediante filtración y, después del lavado, tenía un contenido de materia seca del 30,4 %. La fracción líquida ("solución de deslignificación con NaOH") tenía un pH de 13,0 y se almacenó a 6 °C.

Ejemplo 7

El propósito del ejemplo fue estudiar el efecto del tratamiento alcalino de la paja autohidrolizada sobre la hidrólisis enzimática y el rendimiento de azúcar a partir de paja autohidrolizada. Para conseguir esto, se preparó una suspensión con una consistencia del 7,5 % mediante la mezcla de 15 g de materia seca de paja autohidrolizada del Ejemplo 1 con agua desionizada y los productos químicos enumerados en la Tabla 1. Los diferentes productos químicos alcalinos se utilizaron para ajustar el pH al valor indicado antes del calentamiento. La suspensión se calentó rápidamente a 90 °C en un horno de microondas. La suspensión caliente se filtró para separar las fracciones sólida y líquida. La fracción sólida se lavó con agua y la torta de filtración se agitó hasta homogeneidad y se midió su contenido de materia seca. La fracción sólida lavada (10 g de materia seca) se hidrolizó con 350 µl (6 FPU/g) de preparación celulolítica Flashzyme Plus (Roal, Finlandia) a una consistencia del 10 % en tampón de acetato de sodio 0,05 M a pH 5 en presencia de sorbato de potasio. La hidrólisis se llevó a cabo en un matraz cónico de 250 ml colocado en una incubadora termostática a 50 °C. La reacción continuó con agitación a 200 rpm durante 72 h. Los azúcares monoméricos liberados se determinaron a partir de la fracción líquida mediante HPLC. La materia seca obtenida y los rendimientos de azúcar se presentan en la Tabla 1.

El ejemplo muestra que la deslignificación de la paja autohidrolizada aumenta el rendimiento de azúcar de la paja autohidrolizada mediante hidrólisis enzimática incluso cuando se tienen en cuenta las pérdidas de materia seca en el tratamiento de deslignificación. Otra ventaja del tratamiento de deslignificación es la generación de una fracción de lignina soluble adecuada para su posterior procesamiento.

El hallazgo sorprendente del ejemplo fue que solo se necesita una pequeña cantidad de producto químico alcalino en la deslignificación de la paja autohidrolizada. Otro hallazgo sorprendente fue que el pH de la fracción líquida aislada de la fracción sólida deslignificada era relativamente bajo, lo que significa que se necesita una menor cantidad de ácido para precipitar la lignina de la solución mediante la disminución del pH.

Ejemplo 8

El propósito del ejemplo fue estudiar el efecto del almidón catiónico en la precipitación de lignina a partir del líquido de deslignificación donde la alcalinidad es causada por NaOH. En el experimento, se pesaron 15 g de solución de lignina NaOH a pH 10 del Ejemplo 6 (1,5 % de contenido de materia seca) en un tubo de ensayo de vidrio. Se añadió un peso preciso de almidón catiónico "Raifix 25035" (Chemigate, Finlandia) al tubo de ensayo. El tubo que contenía la mezcla se cubrió con corcho de caucho, se agitó para mezclar los ingredientes y se dejó reposar a temperatura ambiente. Dependiendo de la cantidad de almidón catiónico agregado, pero generalmente después de unos minutos, se observó una separación de fases en la mezcla. Después de 4 h, se retiró una muestra de 0,1 ml de la fase superior de la mezcla diluida 1:10 en agua alcalina, se centrifugó 5 min a 10000 g, y se midió la absorbancia a 280 nm y 600 nm del sobrenadante con diluciones apropiadas en agua alcalina. En comparación con la absorbancia de la solución de lignina no tratada, se calculó el porcentaje de disminución de la absorbancia a 280 nm o 600 nm. La disminución de la absorbancia del sobrenadante indica la eliminación de lignina (precipitación) del líquido por el compuesto catiónico (almidón catiónico).

Los resultados en la Figura 5 muestran el efecto de la dosificación de almidón catiónico sobre el porcentaje de disminución de la absorbancia de UV a 280 nm o la materia disuelta. La absorbancia fue claramente la que más disminuyó cuando la dosis de almidón catiónico estaba entre 0,2 g/g y 0,6 g/g con las cantidades administradas basada en la materia seca. Después de 24 h de incubación, la fase líquida se decantó y se pasó a través de un filtro de sinterización de vidrio de porosidad de grado 1. El filtrado se recogió y se analizó para pH que muestra valores entre pH 9,4 y pH 9,6 y para la solución no tratada pH 9,5. La dosis de almidón catiónico no se pudo atribuir a un cambio en el pH, pero, en cambio, la disminución del pH inicial 10 probablemente se debió a la absorción de dióxido de carbono del aire. Tanto el análisis gravimétrico como el espectrofotométrico dieron un resultado similar con respecto a la precipitación máxima observada.

Los resultados indican que se puede utilizar un compuesto catiónico, como el almidón catiónico, para precipitar la lignina del líquido de deslignificación alcalina, donde la alcalinidad es causada por un compuesto de hidróxido, tal como NaOH, sin ajuste del pH.

Ejemplo 9

El propósito del ejemplo fue estudiar el efecto del almidón catiónico en la precipitación de lignina a partir del líquido de deslignificación donde la alcalinidad es causada por Na₂CO₃ en vez de NaOH. La solución de deslignificación con

Na₂CO₃ a pH 9,8 del Ejemplo 5 se trató con el almidón catiónico "Raifix 25035" como se describió anteriormente, pero con una dosis menor del almidón catiónico. La disminución de la absorbancia a 280 nm después de 4 horas de incubación se midió en relación con la absorbancia medida a partir de la solución de lignina no tratada. Los resultados presentados en la Figura 6 muestran una tendencia creciente entre la dosificación del almidón catiónico y la disminución de la absorbancia a 280 nm. Se obtuvo una reducción de hasta el 79 % en la absorbancia a 280 nm cuando la dosis de almidón catiónico a materia seca de la solución de lignina fue de 0,35 g/g.

Para ilustrar el efecto del almidón catiónico en la precipitación de soluciones de deslignificación, en la Figura 7 se muestra una fotografía de los tubos tomada después de 8 horas de tiempo de reacción. En contraste con la ligera disminución de la alcalinidad en el Ejemplo 8 después de 24 horas de reacción, no se observó ningún cambio en el pH en el ejemplo actual.

La observación visual de los tubos que se muestra en la Figura 7 confirmó los resultados cuantitativos de la precipitación de lignina. De los resultados mostrados en las Figuras 5 y 6 se desprende que el almidón catiónico "Raifix 25035" precipitó hasta el 80 % del material absorbente de luz ultravioleta de las soluciones de deslignificación.

Los resultados indican que se puede utilizar un compuesto catiónico, como el almidón catiónico, para precipitar la lignina del líquido de deslignificación alcalina, donde la alcalinidad es causada por un compuesto carbonato, tal como Na₂CO₃, sin ajuste del pH.

Ejemplo 10

El propósito del ejemplo fue estudiar el efecto de la alcalinidad sobre la precipitación de lignina por almidón catiónico. Se obtuvo una solución no alcalina mediante acidificación de la solución de deslignificación con NaOH del Ejemplo 6 con ácido sulfúrico 6 M a pH 5. La fracción líquida ("líquido no alcalino") se separó de los sólidos precipitados mediante centrifugación y filtración. Se trataron 15 g del líquido (6,3 % de contenido de materia seca) con el almidón catiónico "Raifix 25035" como se describe anteriormente en el Ejemplo 9, pero a diferentes dosis del almidón catiónico. La disminución de la absorbancia a 280 nm después de 4 horas de incubación se midió en relación con la absorbancia medida a partir de la solución de lignina no tratada. Los resultados presentados en la Figura 8 muestran que la disminución de la absorbancia a 280 nm estaba entre el 8 % y el 24 % cuando la relación entre la dosis de almidón catiónico y la materia disuelta total estaba entre 0,01 g/g y 0,07 g/g. Cabe señalar que el líquido no alcalino a pH 5 contenía una gran proporción de su materia disuelta como sales de sulfato. Para ilustrar adicionalmente el efecto del almidón catiónico en el líquido no alcalino, en la Figura 9 se muestra una fotografía de los tubos tomada después de 24 horas de tiempo de reacción.

Como se ha indicado en la Figura 8, se obtuvo un bajo grado de precipitación del líquido no alcalino a pH 5 cuando se complementó con almidón catiónico "Raifix 25035". Por lo tanto, la presente invención da como resultado una precipitación más eficaz de lignina a partir de soluciones alcalinas en comparación con la precipitación de lignina a partir de soluciones no alcalinas.

Ejemplo 11

Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 100 kg de paja de trigo limpiada previamente que contenía el 7 % de humedad con 374 kg de solución de reciclado de deslignificación alcalina con un contenido de materia seca del 6,4 % y un pH de 12,8. La suspensión se sometió a un tratamiento de deslignificación a una temperatura de 70 °C y un pH de 12 durante 2 horas. La fracción sólida extraída se separó de la fracción líquida mediante filtración por presión, y se lavó con agua. La paja extraída con NaOH tenía un contenido de materia seca del 35 % y contenía principalmente celulosa y xilano.

La fracción líquida (solución de deslignificación con NaOH) se trató con 1,2 kg de almidón catiónico (Raifix 01035) con un contenido de materia seca del 40 % para obtener un precipitado sólido que contenía lignina y una fracción líquida alcalina. El precipitado se separó de la fase líquida alcalina mediante sedimentación y centrifugación y el líquido alcalino se recicló al tratamiento de deslignificación.

Este ejemplo muestra que la lignina se puede separar de manera eficaz del material lignocelulósico pretratado y que la lignina disuelta se puede recuperar de la solución de deslignificación con NaOH mediante la floculación con un compuesto catiónico. El ejemplo indica que el líquido de deslignificación alcalina se puede reciclar después de la precipitación de lignina mediante un compuesto catiónico y la eliminación del precipitado.

Ejemplo 12

Precipitación de lignina disuelta en soluciones alcalinas

La paja de trigo se molió con un molino de martillo y se sumergió una porción de 2,445 kg en 46,615 kg de agua para formar una masa total de 49,060 kg. Esta mezcla se hizo alcalina mediante 771 gramos de una solución de

NaOH al 50 %. La suspensión se calentó en una cámara de mezcla de 200 l durante 4 horas a 60 °C con una mezcla a 100 rpm. A continuación, la suspensión se filtró a la misma temperatura. El sobrenadante alcalino, con un contenido de materia seca del 2,8 %, se tomó para el tratamiento posterior.

- 5 El sobrenadante se complementó con almidón catiónico (Raifix 25035) a una concentración del 5 % (p/p). La precipitación formada se separó y, posteriormente, la concentración de peso seco del sobrenadante fue del 2,5 %.

10 En otro experimento, el sobrenadante que tenía un contenido de materia seca del 2,8 % se complementó con acetato de Ca o CaCl₂ a una concentración de Ca²⁺ del 2 %, calculada por peso seco del sobrenadante. Después de la separación del precipitado, el contenido de materia seca se determinó como se muestra en las Tablas 2 y 3.

15 Todavía en otro conjunto de experimentos, el sobrenadante alcalino con un contenido inicial de materia seca del 2,8 % se trató primero con el almidón catiónico como se describió anteriormente y después de la eliminación del precipitado, el sobrenadante se trató con las sales de calcio como también se describió anteriormente. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Precipitación de lignina a partir de sobrenadante alcalino mediante acetato de Ca y mediante tratamientos consecutivos, primero con almidón catiónico y luego con acetato de Ca.

Muestra	Materia seca en el sobrenadante, %	Ca ²⁺ añadido, % de materia seca del sobrenadante	Materia seca del sobrenadante después de la eliminación del precipitado, %
Sobrenadante de lignina alcalina	2,73 %	2,9 %	3,1 %
Sobrenadante de lignina alcalina	2,73 %	5,8 %	2,65 %
Sobrenadante de lignina alcalina después del tratamiento con almidón catiónico	2,84 %	5,6 %	2,73 %

20 **Tabla 3.** Precipitación de lignina a partir de sobrenadante alcalino mediante acetato de Ca y mediante tratamientos consecutivos, primero con almidón catiónico y luego con acetato de Ca.

Muestra	Materia seca en el sobrenadante, %	Ca ²⁺ añadido, % de materia seca del sobrenadante	Materia seca del sobrenadante después de la eliminación del precipitado, %
Sobrenadante de lignina alcalina	2,73	2,4	2,77
Sobrenadante de lignina alcalina después del tratamiento con almidón catiónico	2,84	2,5	2,45

25 El ejemplo muestra que la lignina se puede eliminar de las soluciones alcalinas mediante precipitación, lo que permite el uso de sobrenadante deslignificado como fuente de álcali en el tratamiento de la lignocelulosa.

25 Ejemplos de hidrólisis enzimática de paja autohidrolizada y/o deslignificada

Ejemplo 13

30 Se realizó una comparación de la paja deslignificada con NaOH (material del Ejemplo 6) y la paja autohidrolizada (material del Ejemplo 1) en tres procesos diferentes de hidrólisis enzimática, incluida la hidrólisis discontinua, la hidrólisis secuencial y el reciclado de sólidos en una alimentación constante del proceso. Se utilizó una mezcla de enzimas, que comprendía 85 % de celulasa (Econase CE, Roal Oy), 10 % de celobiasa (Novozyme 188, Sigma/Novozymes) y 5 % de xilanasas (GC140, Genencor). Las reacciones se realizaron a pH 5 y a una temperatura
35 de 50 °C en un agitador a 200 rpm.

Hidrólisis discontinua

40 Se realizó una hidrólisis discontinua a la paja deslignificada con NaOH y a la paja autohidrolizada con una consistencia del 10 % y una consistencia del 8 % (donde "consistencia" era la proporción de sólidos insolubles en la emulsión de reacción, p/p). Se utilizó una dosis de enzima que contenía una actividad enzimática de 9 FPU/g de DM de paja pretratada. Los rendimientos de azúcar (los azúcares anhidros liberados como porcentaje de los hidratos de carbono poliméricos totales en el material), se muestran en la Figura 10. Después de 24 h, 48 horas y 72 horas de hidrólisis, los rendimientos de azúcar de la paja deslignificada con NaOH al 8 % y 10 % de consistencia promediaron
45 el 50 %, 65 % y 74 %, mientras que con la paja autohidrolizada, los rendimientos al 8 % y 10 % de consistencia promediados fueron el 49 %, 56 % y 59 %, respectivamente, mostrando que se puede obtener un mayor rendimiento de azúcar a partir de paja deslignificada con NaOH con la misma cantidad de enzima que a partir de paja autohidrolizada. Los rendimientos fueron generalmente ligeramente más altos en la consistencia más baja.

La productividad volumétrica mostrada en la Figura 12 de la hidrólisis discontinua de 48 horas y 72 horas de paja deslignificada con NaOH fue de 1,32 g/l/h (gramos de azúcar por litro de emulsión de reacción por hora) y 0,82 g/l/h, respectivamente, que fueron considerablemente más altas en comparación con las productividades volumétricas de 0,74 g/l/h y 0,42 g/l/h, respectivamente, obtenidas de paja autohidrolizada.

La productividad de la enzima (kg de azúcar obtenida con un litro de enzima) de las reacciones se muestra en la Figura 11. La productividad de la enzima en la hidrólisis discontinua de 72 horas de la paja deslignificada con NaOH fue de 4,2 kg/l de enzima, que fue casi el doble en comparación con la productividad de la enzima de 2,2 kg/l con la paja autohidrolizada.

Este ejemplo indica que se obtuvo un mayor rendimiento de azúcar, productividad de la enzima y productividad volumétrica a partir de paja deslignificada en comparación con la paja autohidrolizada en una hidrólisis enzimática discontinua.

15 **Hidrólisis secuencial**

La paja deslignificada con NaOH y la paja autohidrolizada se hidrolizaron mediante una hidrólisis en tres etapas que consistió en tres reacciones secuenciales de 24 horas. Entre las reacciones, el líquido se separó de los sólidos y el residuo sólido se mezcló con líquido fresco y enzimas. La proporción de sólidos en el proceso total ("la consistencia total" o "la consistencia de la alimentación") fue del 10 % en las dos primeras reacciones y del 8 % en la tercera reacción. Debido a que la cantidad de líquido total se dividió entre las reacciones, la consistencia real de la primera, segunda y tercera reacción fue de 14,3 %, 12,5 % y 10,6 % con paja deslignificada con NaOH y 14,4 %, 12,9% y 12,8% con paja autohidrolizada, respectivamente. Se utilizaron un cóctel de enzimas y unas dosis similares, como se describe en "hidrólisis discontinua de paja deslignificada con NaOH". Dos tercios (66,6 %) de la dosis total de enzima se aplicaron en la primera reacción y un tercio (33,3 %) en la segunda reacción.

El rendimiento de azúcar (los azúcares anhidros liberados como porcentaje de los hidratos de carbono poliméricos totales en el material, Figura 10) después de la primera, la segunda y la tercera reacción fue de 35 %, 57 % y 70 %, respectivamente, a partir de paja deslignificada con NaOH y 36 %, 55 % y 65 %, respectivamente, a partir de paja autohidrolizada. Aunque el rendimiento fue ligeramente más alto de la paja autohidrolizada después de la primera reacción, el rendimiento de la paja deslignificada con NaOH prevaleció claramente después de la segunda y tercera reacción. La productividad volumétrica total (Figura 12) después de dos y tres reacciones secuenciales de 24 horas fue de 1,74 g/l/h y 1,61 g/l/h, respectivamente, con paja deslignificada con NaOH, que fue considerablemente mayor en comparación con las productividades de 1,10 g/l/h y 0,94 g/l/h, respectivamente, a partir de paja autohidrolizada. La productividad de la enzima después de tres reacciones de 24 horas con paja deslignificada con NaOH fue de 4,4 kg/l de enzima, que fue notablemente mayor en comparación con la productividad de la enzima de 2,4 kg/l con paja autohidrolizada (Figura 11).

Este ejemplo indica que se obtuvo un mayor rendimiento de azúcar, productividad de la enzima y productividad volumétrica a partir de paja deslignificada en comparación con la paja autohidrolizada en una hidrólisis enzimática secuencial.

Hidrólisis con reciclado de sólidos

La paja deslignificada con NaOH y la paja autohidrolizada se hidrolizaron en un proceso de reciclado de sólidos. Se realizaron múltiples reacciones subsiguientes, donde se mezclaron paja fresca pretratada, enzima y líquido con una consistencia del 10 %. En la mezcla de componentes de reacción frescos, se mezcló el 50 % del residuo sólido separado de la reacción anterior. El reciclado del residuo sólido condujo a un aumento en la consistencia real de la reacción, que se incrementó a un 12,3 % con paja deslignificada con NaOH y a un 13,2 % con paja autohidrolizada. Se realizaron seis reacciones de reciclado posteriores para alcanzar una situación de equilibrio, donde el volumen de reacción, la consistencia y el rendimiento de hidrólisis permanecieron constantes entre las reacciones subsiguientes. Cuando se alcanzó la situación de equilibrio, la parte del residuo sólido que no se recicló se mezcló con una cantidad constante de líquido fresco y se realizó una reacción adicional de 24 h, con una consistencia del 10,5 % con paja deslignificada con NaOH y del 13,1 % con paja autohidrolizada. La proporción total de sólidos (o "la consistencia total" o "la consistencia de la alimentación") fue del 10 % solo en la reacción de reciclado y del 8 % en el proceso que incluye la reacción de reciclado y la reacción adicional.

El rendimiento de azúcar como azúcares anhidros liberados como porcentaje de los hidratos de carbono poliméricos totales en el material, (Figura 10) en la reacción inicial que no contenía ningún material reciclado fue del 51 % y el 50 % para la paja deslignificada con NaOH y la paja autohidrolizada, respectivamente. Después de seis reacciones posteriores con el 50 % de reciclado del residuo sólido, el rendimiento de hidrólisis se incrementó al 57 % y 55 % con paja deslignificada con NaOH y paja autohidrolizada, respectivamente. Después de la reacción adicional, el rendimiento total de azúcar fue del 69 % y el 65 % con paja deslignificada con NaOH y paja autohidrolizada, respectivamente, mostrando así rendimientos generalmente más altos para paja deslignificada con NaOH. La productividad volumétrica de la reacción de reciclado solo con paja deslignificada con NaOH y paja autohidrolizada fue de 1,99 g/l/h y 1,17 g/l/h, respectivamente, e incluyendo la reacción adicional, 1,77 g/l/h y 0,99 g/l/h,

respectivamente, mostrando una productividad volumétrica considerablemente mayor con paja deslignificada con NaOH. La productividad de enzimas de la reacción de reciclado solo con paja deslignificada con NaOH y paja autohidrolizada fue de 3,2 kg/l y 2,0 kg/l, respectivamente, y cuando se incluyó la reacción adicional, 3,8 kg/l y 2,4 kg/l, respectivamente, mostrando una productividad enzimática notablemente mayor para la paja deslignificada con NaOH en comparación con la paja autohidrolizada.

La progresión de la hidrólisis en las reacciones posteriores se presenta en la Figura 13a. La progresión del volumen de reacción se presenta en la Figura 13b. La progresión de la consistencia de reacción se presenta en la Figura 13c.

Este ejemplo indica que se obtuvo un mayor rendimiento de azúcar, productividad de la enzima y productividad volumétrica a partir de paja deslignificada en comparación con la paja autohidrolizada en un proceso de hidrólisis enzimática con reciclado de sólidos.

Conclusiones del Ejemplo 13

1. El rendimiento global de azúcar fue generalmente mayor para la paja deslignificada con NaOH en comparación con la paja autohidrolizada en todos los diferentes procesos.

2. Dado que la productividad volumétrica fue mayor con la paja deslignificada con NaOH en comparación con la paja autohidrolizada en todos los diferentes procesos, se requieren reactores y centrifugas más pequeñas para una tasa de producción de azúcar dada en la hidrólisis de la paja deslignificada con NaOH en comparación con la paja autohidrolizada.

3. Dado que la productividad enzimática fue mayor con la paja deslignificada con NaOH en comparación con la paja autohidrolizada en todos los diferentes procesos, el coste de la enzima por kg de azúcar obtenido es menor con la paja deslignificada con NaOH que con la paja autohidrolizada.

4. Se utilizaron cantidades iguales de agua por paja pretratada en este ejemplo. Se puede concluir que el reciclado de sólidos y la hidrólisis secuencial llevaron a rendimientos de hidrólisis iguales pero aumentaron las productividades volumétricas en comparación con la hidrólisis discontinua.

Ejemplo 14

Preparación de hidrolizados

Líquido C de autohidrólisis

La reacción de autohidrólisis para la paja de trigo y el posterior aislamiento de oligosacáridos de hemicelulosa se llevó a cabo para producir una fracción líquida para la fermentación y una fracción sólida susceptible de hidrólisis enzimática. Para conseguir esto, se mezclaron 35,7 kg de paja de trigo (contenido de materia seca del 89,8 %) con 240 kg de agua dando una suspensión con una consistencia del 11,6 % en un tanque de reactor agitado de 500 dm³. La suspensión se calentó hasta 180 °C, seguido de enfriamiento hasta por debajo de 100 °C. La suspensión tratada hidrotérmicamente se descargó del reactor y la primera fracción líquida se separó de la fracción sólida utilizando una centrifuga decantadora. La fracción sólida se lavó en suspensión en agua ácida ajustada a pH 4 con ácido fosfórico. La fracción sólida se separó de la segunda fracción líquida en una centrifuga decantadora. La primera y segunda fracciones líquidas se combinaron y se concentraron en un evaporador de película descendente para dar 18,3 kg de líquido de autohidrólisis concentrado formando líquido C de autohidrólisis que contiene azúcares de hemicelulosa parcialmente en forma oligomérica y con un contenido de materia seca del 42 % y una sustancia seca refractométrica a 38 °Bx. La fracción sólida lavada (96,7 kg con un contenido de materia seca del 23,0 %) se utilizó como material de alimentación para la hidrólisis enzimática para producir hidrolizado de celulosa para el cultivo.

Parte de los compuestos fenólicos que contenía el líquido concentrado de autohidrólisis se eliminó tratando el líquido mediante la adición de 40 g/l de carbón activado, mezclando suavemente durante 20 horas a 4 °C y finalmente filtrando el carbono con un paño de filtración de 400 µm.

El hidrolizado enzimático de la fracción de celulosa de la paja de trigo se preparó a partir de la fracción sólida que contenía celulosa (después del lavado) del experimento de autohidrólisis en el que se preparó el líquido C de autohidrólisis. La fracción sólida lavada del tratamiento de autohidrólisis que forma el líquido C de autohidrólisis (17,3 kg con un contenido de materia seca del 23,1 %) se pesó en un tanque de reactor agitado de 40 dm³ y se mezcló con 14,7 kg de agua y 10 ml de NaOH al 50 % (p/p) para dar una suspensión con una consistencia del 12,5 % y a pH 5. El reactor se calentó y se mantuvo a 50 °C y 216 ml de mezcla de enzimas que comprendía 82 % de celulosa (Econase CE, Roal Oy), 10 % de celobiasa (Novozyme 188, Sigma/Novozymes) y 7 % de xilanasas (GC140, Genencor). Durante el tratamiento enzimático, la suspensión se agitó periódicamente durante 5 min tres veces por hora. Después de 48 horas de tiempo de residencia, la suspensión se complementó con una mezcla enzimática fresca que representaba el 10 % de la dosis inicial de la enzima y que tenía proporciones similares de enzimas

individuales. Después de 72 horas de tiempo de residencia a 50 °C, la fracción líquida se separó de la fracción sólida mediante filtración utilizando una prensa hídrica. La fracción sólida se lavó una vez con agua y la fracción líquida se separó de nuevo de la fracción sólida. Las fracciones líquidas se combinaron y se concentraron mediante evaporación a presión reducida. El concentrado de hidrolizado celulósico (1,57 kg) contenía 220 g/l de azúcar total.

5 El hidrolizado de celulosa que contenía azúcares monoméricos se utilizó como tal en el cultivo.

Producción de aceite unicelular

10 Los experimentos se realizaron utilizando una cepa fúngica de *Aspergillus oryzae*. A partir del hongo esporulante que creció en placas de PDA, se realizó una suspensión de esporas mediante la adición de 12 ml de agua estéril y las esporas se rasparon con un bucle de inoculación al líquido. Se utilizaron directamente 24 ml de la suspensión de esporas para la inoculación del fermentador. La composición del medio se presenta en la tabla 4. Se utilizó en el cultivo líquido C de autohidrólisis purificado (solución de hemicelulosa, azúcares hemicelulósicos) y el hidrolizado de celulosa del mismo experimento. El cultivo se realizó en Biostat B más 5 l de fermentador en un volumen de 3 l, y se ajustó durante este tiempo la agitación a 500 rpm, el pH se mantuvo en 5,5 con NaOH 3 M, la aireación fue de 1 vvm y la temperatura a 35 °C durante el crecimiento, en la producción de lípidos, se redujo a 28 °C.

Tabla 4: Composición del medio de crecimiento

Componentes del medio	Concentración (g/l)
Azúcares hemicelulósicos	20
Extracto de levadura	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgCl * 6 H ₂ O	1,5
K ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	1,5
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,3

20 Después de la inoculación, pasaron aproximadamente 30 horas antes de que el hongo comenzara a crecer activamente. Durante el cultivo, la solución de hemicelulosa se añadió en pequeños lotes y, después de 95 horas de cultivo, las alimentaciones se cambiaron a hidrolizado celulósico. Durante el cultivo, en total se agregaron 236 g de hemicelulosa y 484 g de hidrolizado de celulosa. Parte de los azúcares añadidos se dejó sin utilizar al final de la fermentación. Después de 167 h, cuando terminó el cultivo, había 16 g/l de biomasa, de los cuales el 43 % eran lípidos (Figura 14). Se pudo concluir que la producción de aceite microbiano a partir de azúcares de celulosa y hemicelulosa de paja de trigo fue exitosa.

30 Ejemplo 15 - Producción de aceite microbiano en azúcares hemicelulósicos

Preparación de hidrolizado, líquido D de autohidrólisis

35 Se preparó una suspensión mediante la mezcla de 10,5 kg de paja de trigo molida (contenido de materia seca del 92,7 %) y 54,1 kg de agua del grifo en un recipiente de 100 dm³. Después de almacenar a temperatura ambiente durante 18 h, se pesaron 64,2 kg de la suspensión en un reactor de autoclave agitado cilíndrico horizontal de 250 dm³. El reactor se cerró y se calentó durante 75 min a 140 °C, se mantuvo a 140 °C durante 5 horas y se enfrió a temperatura ambiente durante 30 min. La suspensión tratada hidrotérmicamente se descargó manualmente del reactor, y la primera fracción líquida se separó del primer sólido mediante filtración. La primera fracción sólida se lavó dos veces con agua del grifo y se prensó utilizando una prensa hídrica que dio una fracción sólida lavada. La fracción sólida lavada (20,9 kg) tenía un contenido de materia seca del 42,7 %. La primera fracción líquida se combinó con las aguas de lavado y se concentró en un evaporador de película descendente hasta un contenido de materia seca del 11,5 % (p/p). El líquido concentrado, Líquido D de autohidrólisis, contenía un 49,3 % de azúcar total de la materia seca total del líquido concentrado según se determinó después de la hidrólisis ácida diluida (ácido sulfúrico al 4 % p/p, 121 °C, 1 h) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Las proporciones relativas de xilosa anhidra, arabinosa anhidra, glucosa anhidra y galactosa anhidra del contenido total de azúcar fueron 57 %, 19 %, 13 % y 11 %, respectivamente.

Después de esto, se utilizó el líquido D de autohidrólisis que contenía azúcares hemicelulósicos parcialmente en forma oligomérica en experimentos de cultivo como tales sin purificación.

50 Producción de aceite unicelular

55 Los experimentos se realizaron utilizando una cepa fúngica *A. oryzae* productora de lípidos. A partir del hongo esporulante que creció en placas de PDA, se realizó una suspensión de esporas mediante la adición de 12 ml de agua estéril y las esporas se rasparon con un bucle de inoculación al líquido. Se utilizaron 24 ml de la suspensión de

esporas para la inoculación de 6 matraces. La composición del medio se presenta en la tabla 5. Los matraces inoculados se incubaron a 30 °C con agitación a 160 rpm durante 1 día, y luego se utilizaron para la inoculación del fermentador.

5 Tabla 5: Composición del medio de inoculación, pH ajustado a 5,5.

	g/l
Azúcares hemicelulósicos	40
Extracto de levadura	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

10 Se utilizó el líquido D de autohidrólisis (que contenía azúcares hemicelulósicos parcialmente en forma oligomérica) y contenía 4,2 g/l de compuestos fenólicos según el análisis con el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). El cultivo se realizó en Biostat B más 5 l de fermentador en un volumen de 3 l, y se ajustó durante este tiempo la agitación a 400 rpm, el pH se mantuvo en 5,5 con NaOH 3 M, la aireación fue de 1 vvm y la temperatura 30 °C. La composición del medio se presenta en la tabla 6.

Tabla 6: La composición del medio de fermentación

Componentes del medio	Concentración (g/l)
Azúcares hemicelulósicos	60
Extracto de levadura	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgCl * 6 H ₂ O	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2

15 Resultados:

20 Durante el cultivo, se añadió la solución hemicelulósica en pequeños lotes. En total se añadieron 150 g de hemicelulosa. Parte de los azúcares añadidos se dejó sin utilizar al final de la fermentación. Después de 142 h, cuando terminó el cultivo, había 14 g/l de biomasa, de los cuales el 21 % eran lípidos. Se pudo concluir que la producción de aceite microbiano a partir de azúcares hemicelulósicos de trigo (parcialmente en forma oligomérica) fue exitosa. La producción de aceite microbiano a partir de azúcares hemicelulósicos fue exitosa sin la purificación del hidrolizado (aparte de la evaporación utilizada en la concentración de azúcares). En la fermentación, la concentración de compuestos fenólicos fue de 2,8 g/l. Por lo tanto, también podría afirmarse que el crecimiento de hongos y la producción de lípidos fueron posibles a pesar de las altas concentraciones de inhibidores.

25

REIVINDICACIONES

1. Método para el fraccionamiento de un material lignocelulósico, comprendiendo el método

- 5 a) Someter el material lignocelulósico a un tratamiento de deslignificación en presencia de un agente de deslignificación alcalina para producir una mezcla que comprende una primera fase sólida y una primera fase líquida que contiene lignina disuelta, en donde el agente de deslignificación alcalina se agrega al material lignocelulósico para obtener una suspensión que tiene un pH superior a 7,
- 10 b) Separar la primera fase sólida de la primera fase líquida,
- c) Introducir un compuesto catiónico en la primera fase líquida para producir una mezcla que comprende una segunda fase sólida y una segunda fase líquida y en donde la segunda fase líquida se separa de la segunda fase sólida y la segunda fase líquida se recicla al paso a),
- 15 d) Someter la primera fase sólida a un tratamiento de hidrólisis enzimática en presencia de enzimas capaces de hidrolizar las fracciones de celulosa y hemicelulosa de la primera fase sólida para producir una mezcla que comprende una tercera fase líquida en forma de un hidrolizado enzimático y una tercera fase sólida.
- 20 e) Separar la tercera fase líquida de la tercera fase sólida, y en donde el compuesto catiónico se selecciona de un grupo que comprende oligómeros y polímeros catiónicos tales como polisacáridos catiónicos de almidón, amilosa catiónica, amilopectina catiónica, dextrano catiónico, oligómeros de lignina catiónicos, polímeros de lignina catiónicos, turba catiónica, o mezclas de los mismos, o en donde el compuesto catiónico es un ion catiónico elemental seleccionado del grupo que comprende metales alcalinotérreos y cationes bivalentes y trivalentes de hierro (Fe) o aluminio (Al) procedentes de compuestos tales como cloruro de aluminio $AlCl_3$, acetato de bario $Ba(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de bario $Ba(HCO_3)_2$, bromuro de bario $BaBr_2$, cloruro de bario $BaCl_2$, formiato de bario $Ba(HCO_2)_2$, (hidróxido de bario $(Ba(OH)_2)$, nitrato de bario $Ba(NO_3)_2$, acetato de calcio $Ca(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de calcio $Ca(HCO_3)_2$, bromuro de calcio $CaBr_2$, cloruro de calcio $CaCl_2$, formiato de calcio $Ca(HCO_2)_2$, (hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$, nitrato de calcio $Ca(NO_3)_2$, acetato de magnesio $Mg(C_2H_3O_2)_2$, bicarbonato de magnesio $Mg(HCO_3)_2$, bromuro de magnesio $MgBr_2$, cloruro de magnesio $MgCl_2$, formiato de magnesio $Mg(HCO_2)_2$, (hidróxido de magnesio $Mg(OH)_2$, nitrato de magnesio $Mg(NO_3)_2$, acetato de hierro $Fe(C_2H_3O_2)_2$, cloruro férrico $FeCl_3$ y los hidratos correspondientes.
- 25
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los polímeros y oligómeros catiónicos tienen una densidad de carga catiónica de 0,5 - 5 meq/g.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de compuesto catiónico es de 0,001 a 0,25 g/g basado en el contenido de materia seca de la primera fase líquida.
- 35
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de deslignificación alcalina se selecciona de un grupo que consiste en hidróxido de sodio, carbonato de sodio, hidróxido potásico, carbonato de potasio, hidróxido de calcio y carbonato de calcio, hidróxido de litio, carbonato de litio, hidróxido de amonio, amoníaco, sulfuro de sodio y los hidratos correspondientes.
- 40
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de agente de deslignificación es del 0,1 al 10 % en peso, más preferentemente el 0,1 - 4 % en peso basado en la cantidad de material lignocelulósico basado en la materia seca.
- 45
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de deslignificación alcalina se agrega al material lignocelulósico para obtener una suspensión que tiene un pH de entre 10 y 13.
- 50
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material lignocelulósico se somete a un tratamiento en el que la hemicelulosa se elimina al menos parcialmente del material lignocelulósico como un hidrolizado de hemicelulosa acuosa, antes de que el material lignocelulósico se someta a la etapa a).
- 55
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la hemicelulosa se elimina al menos parcialmente del material lignocelulósico mediante tratamiento hidrotérmico.

Figura 1

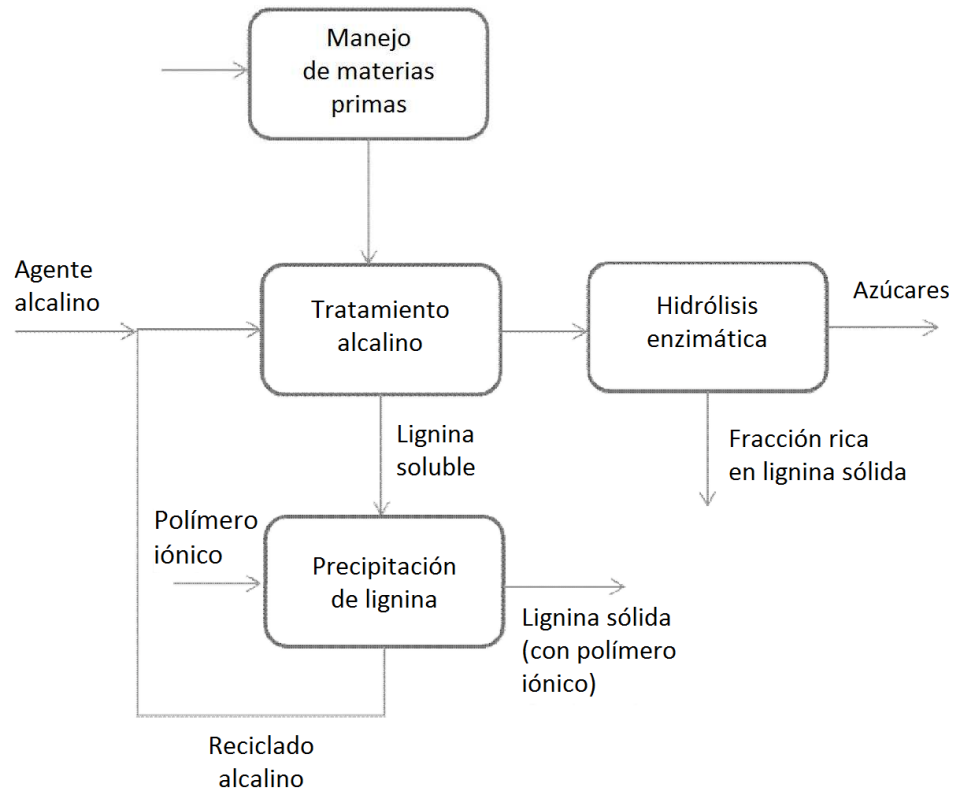


Figura 2

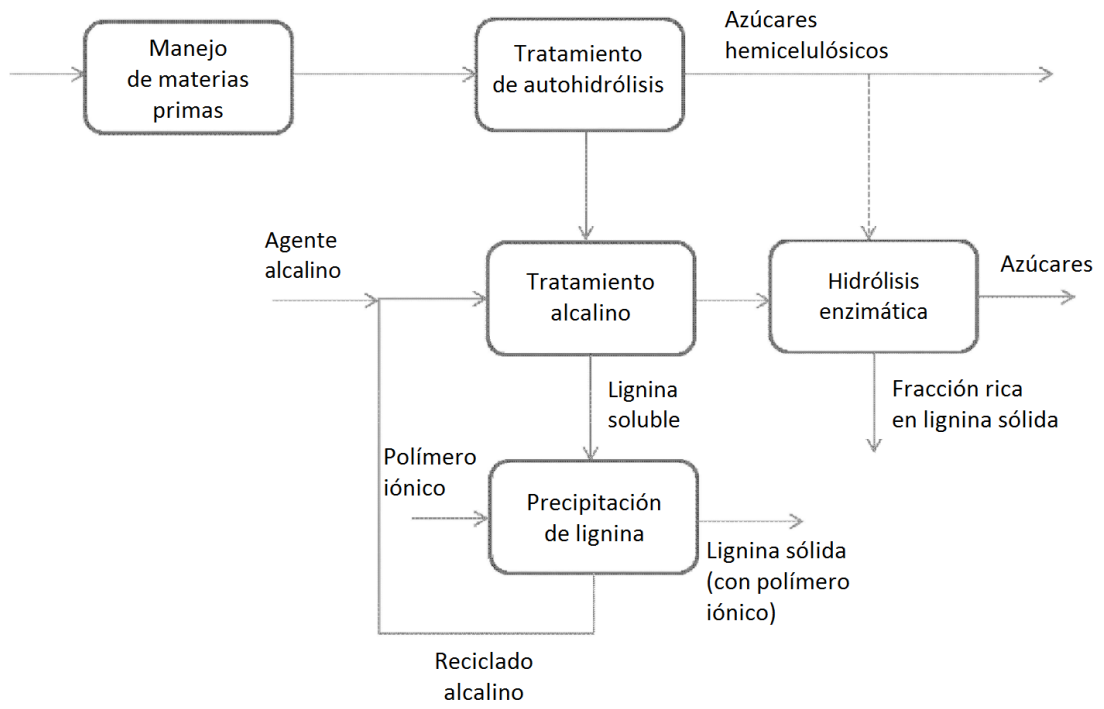


Figura 3

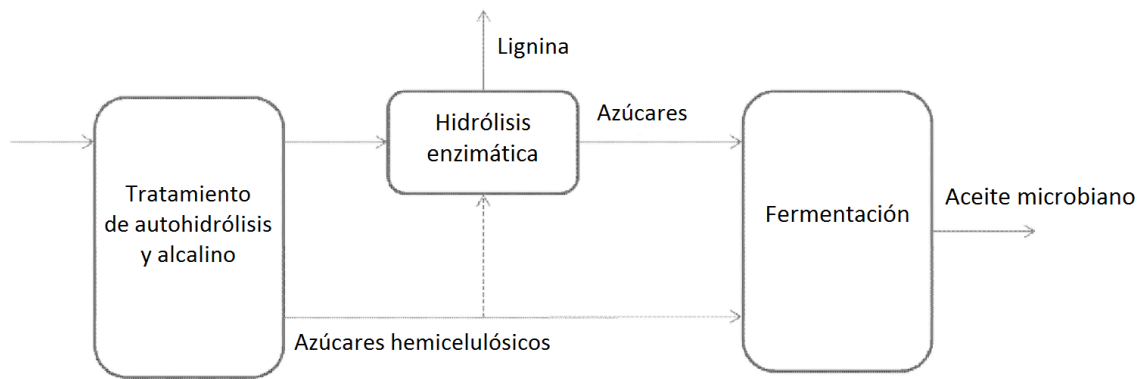


Figura 4

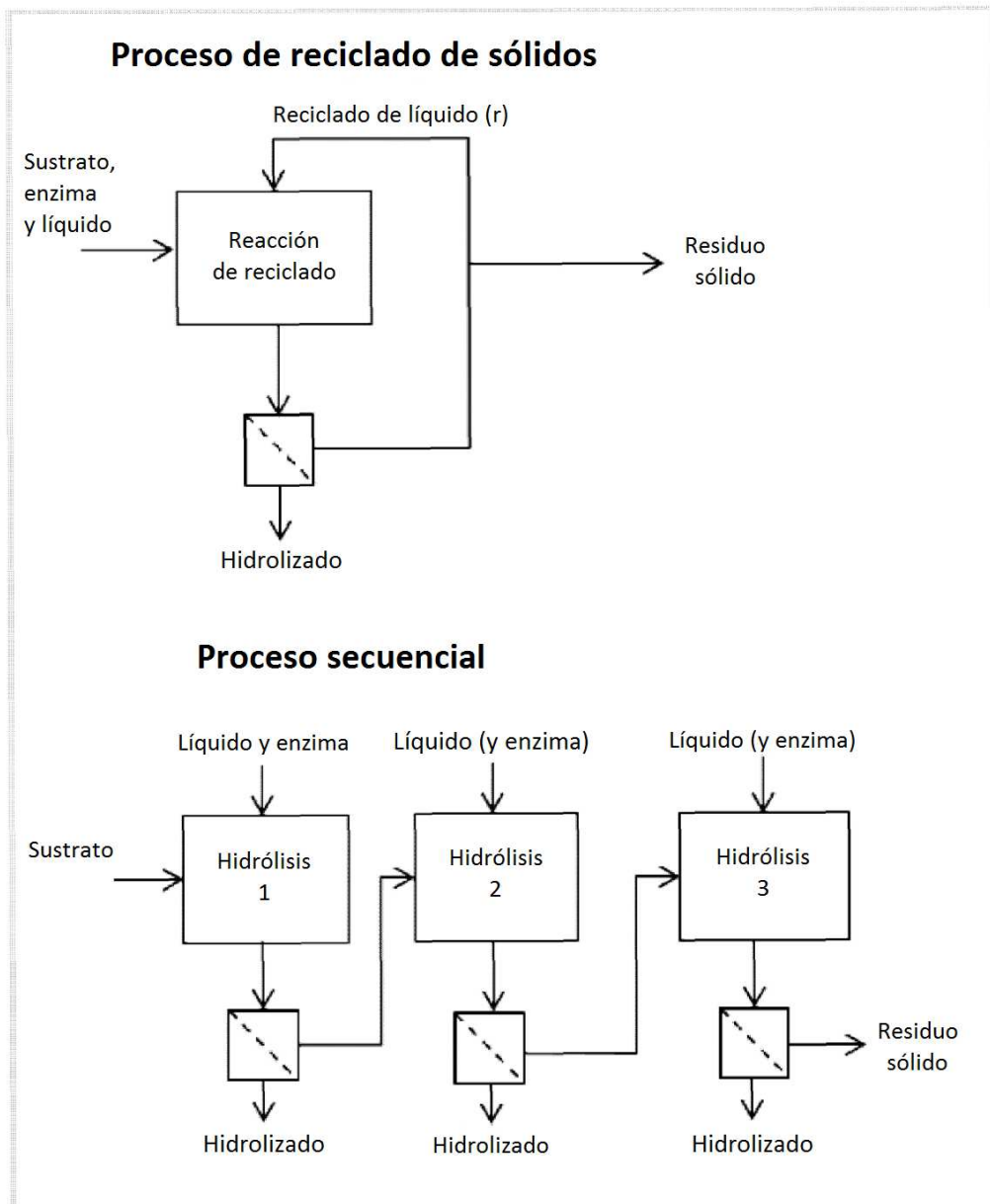


Figura 5

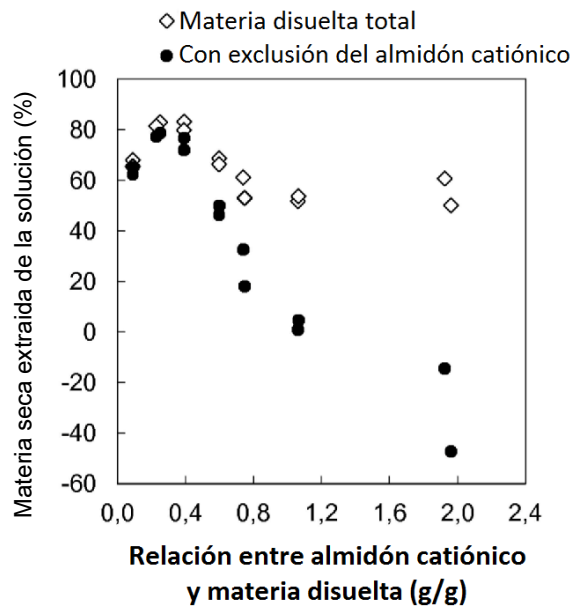
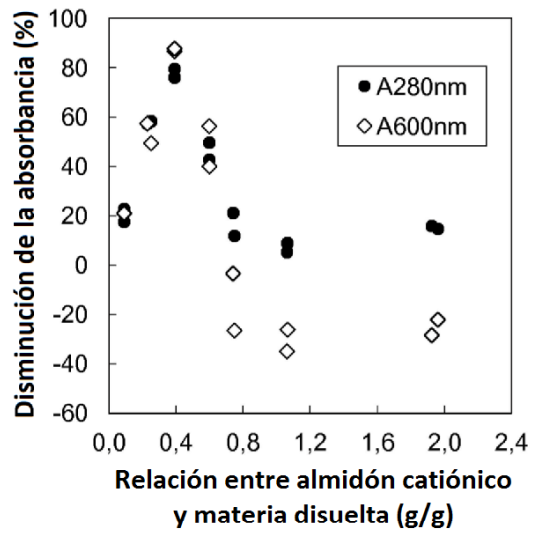


Figura 6

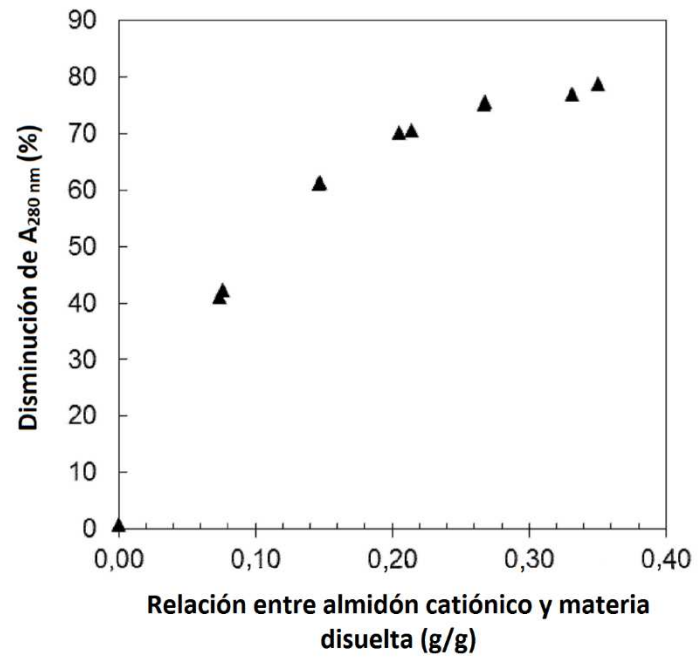


Figura 7

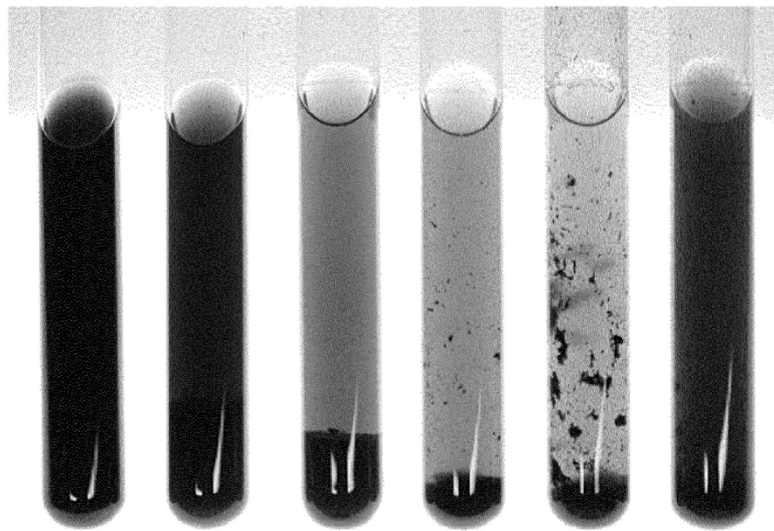


Figura 8

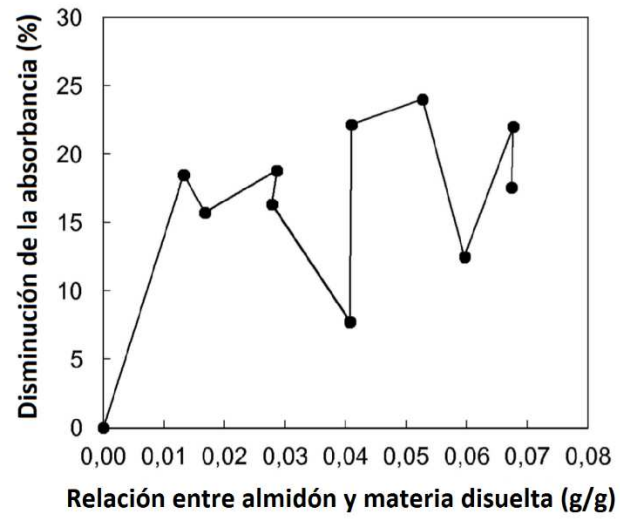


Figura 9

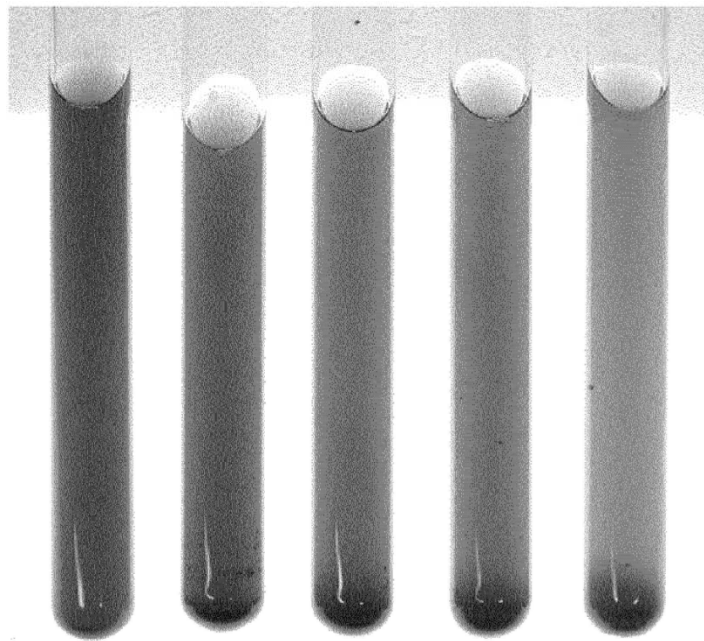


Figura 10

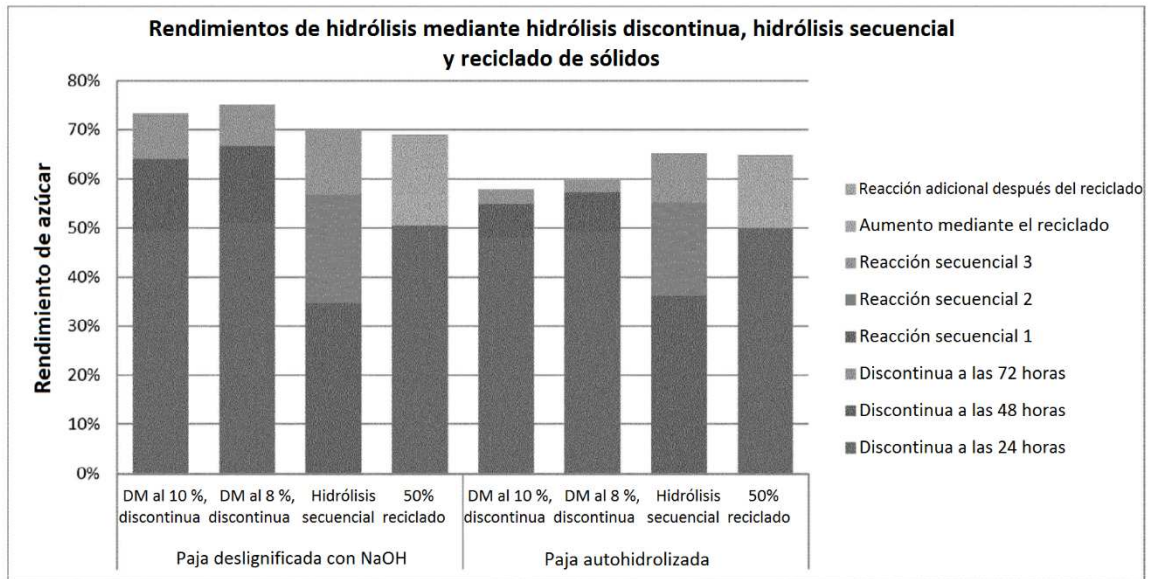


Figura 11

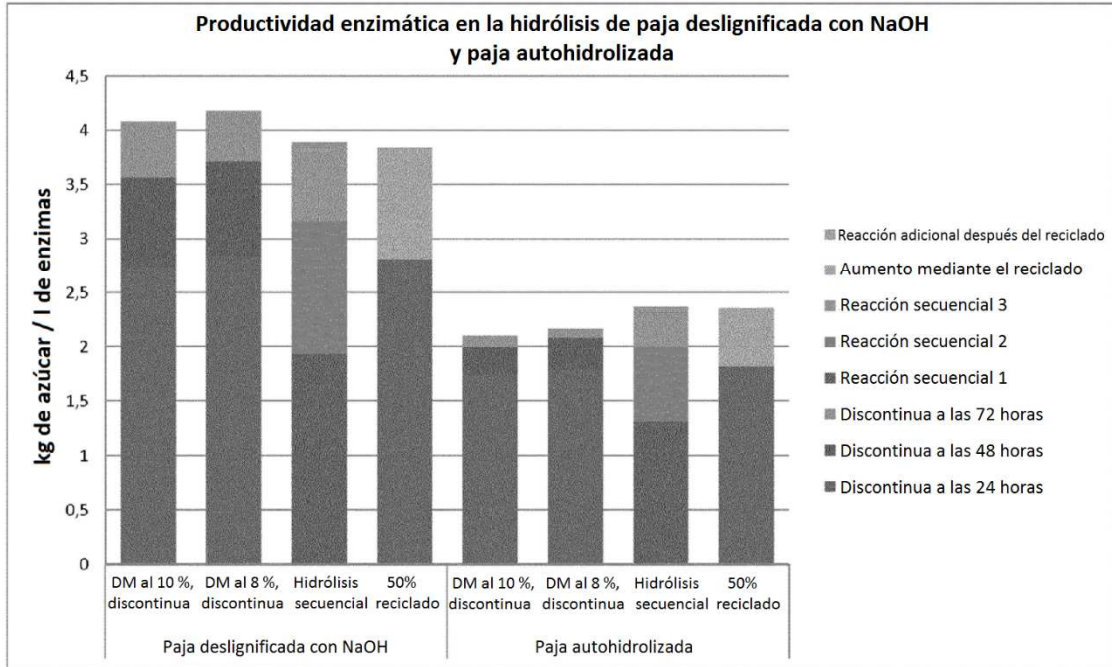


Figura 12

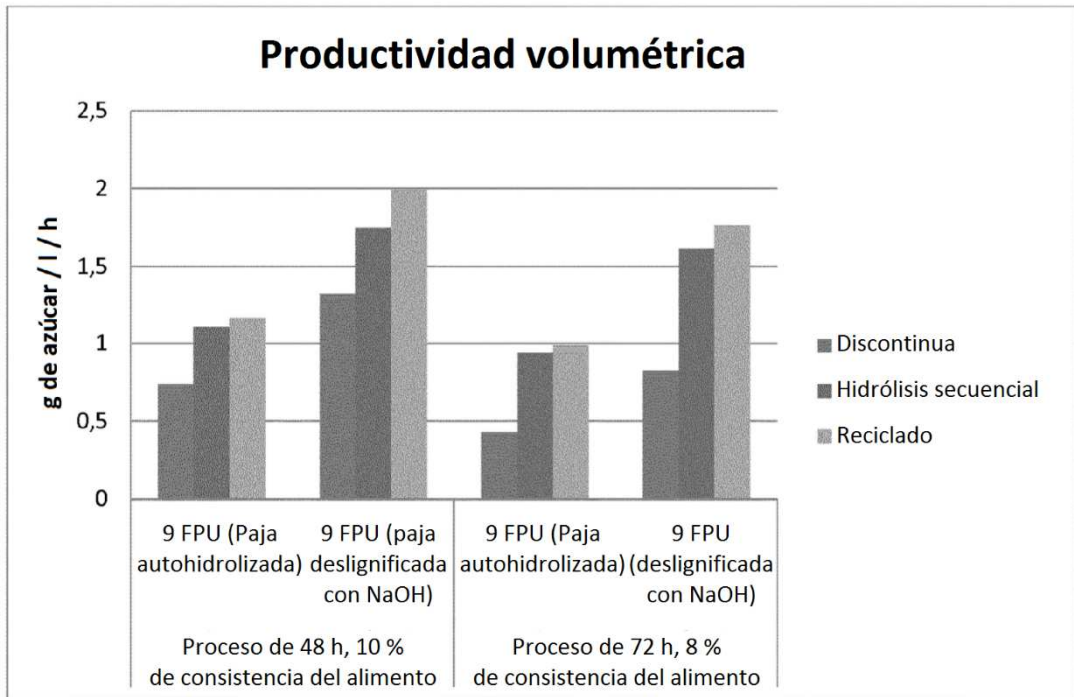


Figura 13

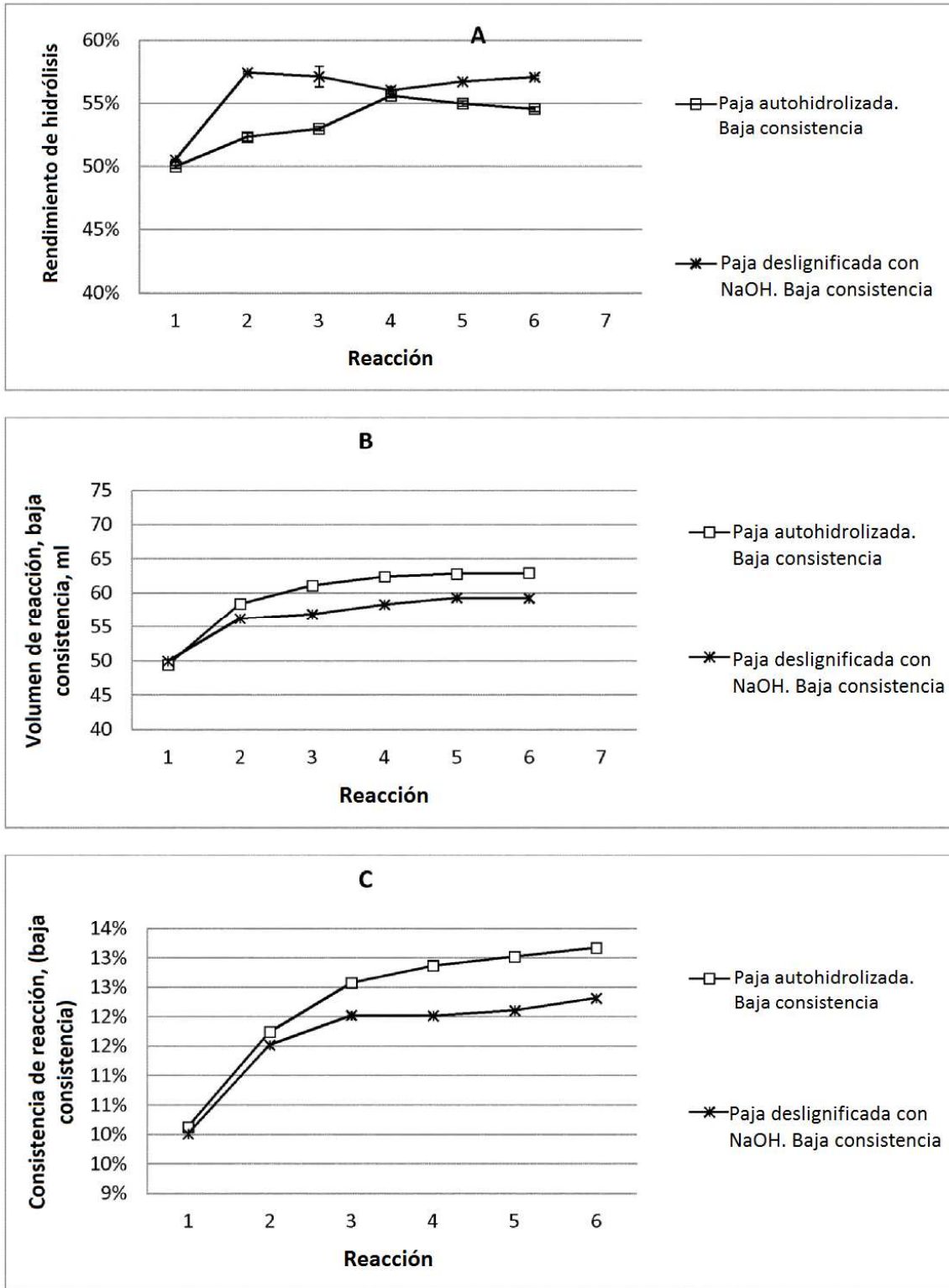


Figura 14

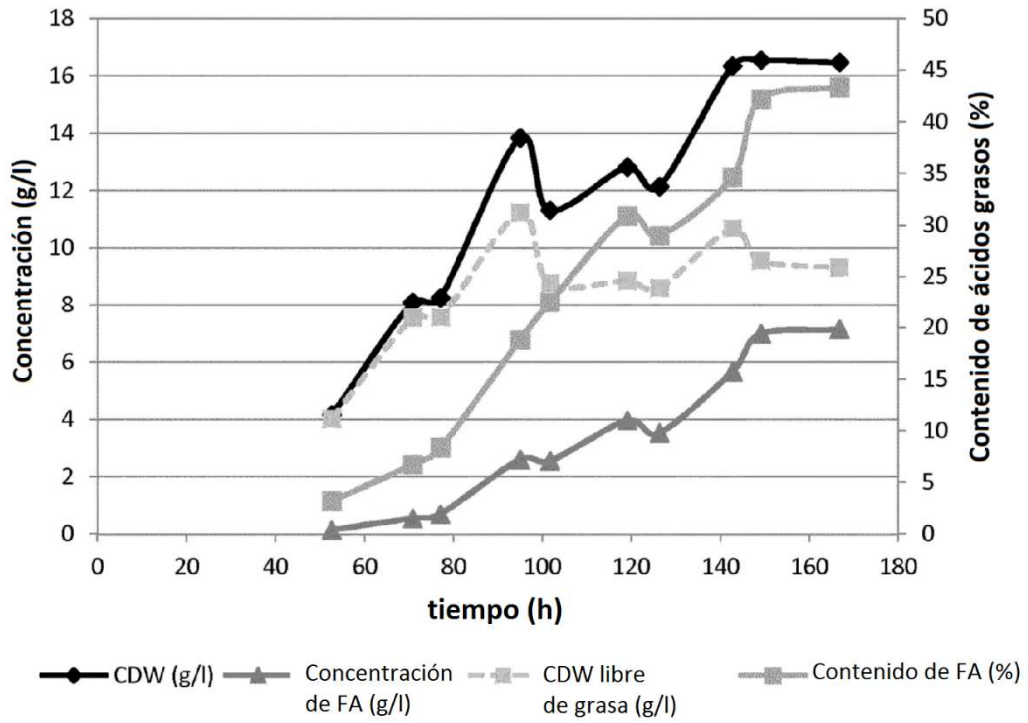


Figura 15

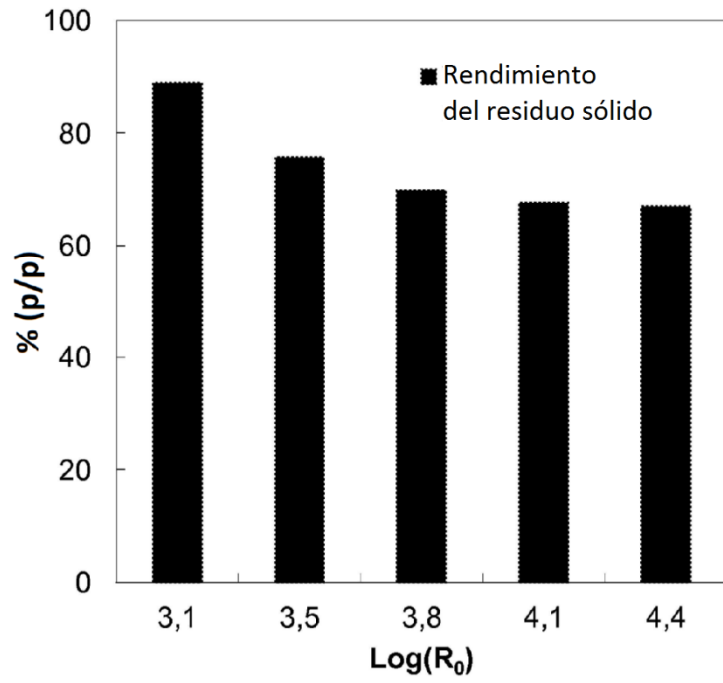


Figura 16

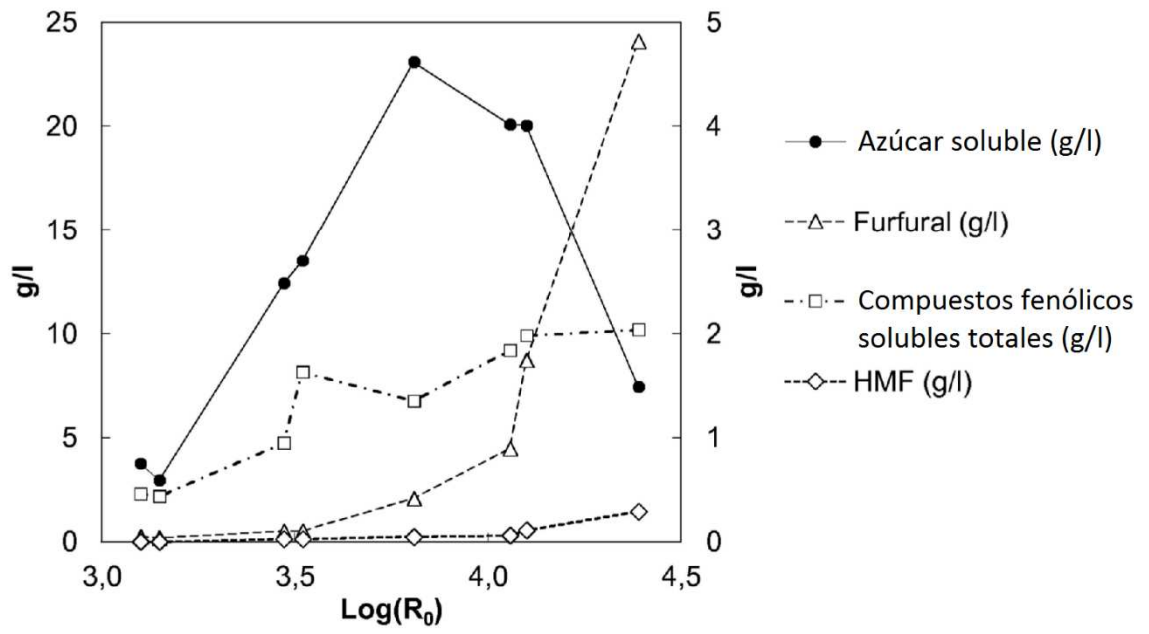


Tabla 1

Tratamiento de deslignificación	Cantidad de producto químico alcalino ^a	pH antes del tratamiento ^b	pH después del tratamiento ^c	Rendimiento de DM ^d	Rendimiento de azúcar monomérico basado en DM de paja deslignificada ^e	Rendimiento de azúcar basado en DM de paja autohidrolizada (%) ^f	Rendimiento de azúcar basado en hidratos de carbono de paja autohidrolizada (%) ^g
Solución de H ₂ O ₂ al 2 % + NaOH	3,3	10,2	8,5	77	0,48	37,0	63,1
Ca(OH) ₂	Solución saturada al 3 %	10,30	9,3	91	0,41	37,3	63,7
Solución de H ₂ O ₂ al 1 % + Ca(OH) ₂	Solución saturada al 3 %	9,30	7,8	91	0,42	38,2	65,2
NaOH	0,85	10,0	8,8	89	0,44	39,5	67,4
Paja AH sin deslignificación	0	5,2	5,3	100	0,36	36,0	61,4

^a % de paja autohidrolizada en base de materia seca

^b pH del líquido antes de calentar

^c pH del líquido después de calentar y filtrar los sólidos

^d % de materia seca que queda después del tratamiento de deslignificación

^e relación entre azúcares monoméricos obtenidos a partir de hidrólisis enzimática y materia seca de paja deslignificada g/g

^f relación entre azúcares obtenidos a partir de hidrólisis enzimática y materia seca de paja autohidrolizada

^g calculado como la relación entre la cantidad total de monosacáridos liberados en la hidrólisis enzimática y la cantidad total de monosacáridos liberados de un peso similar de paja autohidrolizada en hidrólisis ácida multiplicada con el rendimiento de materia seca del tratamiento de deslignificación